



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

CAIO SANTOS SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *DGAT1* E *GH* EM
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

Belém
2014

CAIO SANTOS SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *DGAT1* E *GHEM*
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*).

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques

Belém
2014

CAIO SANTOS SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *DGAT1* E *GH* EM
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*).

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de Concentração: Produção Animal

Data da Aprovação. Belém – PA: 11/03/2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental.
Orientador
Presidente da Banca

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Instituição: Universidade Federal Rural da
Amazônia-UFRA.

Profa. Dra. Maria Rosa Travassos da Rosa Costa
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental.

Ofereço aos meus pais, Maria Valdílea dos Santos e Raimundo Nonato Pereira da Silva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, proteção e por ter permitido mais esta vitória.

Aos meus pais pelo apoio incondicional. Um simples obrigado é pouco. Saibam que as alegrias de hoje são de vocês, pois foram o seu amor, o estímulo e o carinho as armas para mais esta conquista.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade do desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Genética e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudo.

A Universidade Federal de Pará (UFPA), pela oportunidade de realização desta Pós e aos professores.

Ao Dr. José Ribamar Felipe Marques, pela orientação, confiança, paciência, amizade e pelos importantes ensinamentos a mim repassados.

As Dras. Ilmarina, Iracilda, Ândrea pelo apoio na realização do sequenciamento e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Alex Sandro Schierholt, pelas discussões, apoio e amizade.

A Amanda Matos, pela contribuição na revisão da dissertação, na plotagem dos dados de produção e pela amizade.

Aos assistentes do Laboratório de Genética da Embrapa Leonária, Pedro, Anderson e Izaias, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório Monika, Ilenilce, Francisca, Lígia, Hellen, Sidney, Moisés, Alan e Luany, muito obrigado pelo apoio, pelos momentos de descontração e principalmente pela amizade.

Aos meus amigos, Andréa, Dayvison, Girena, Jennifer, Neto, Thiago pelo incentivo, apoio e amizade verdadeira.

A todos que não foram citados, mas nem por isso esquecidos, e que contribuíram de alguma maneira para o êxito desse trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Os búfalos são animais domésticos pertencentes ao gênero *Bubalus*, família Bovidae da ordem Artiodactyla. Fornecem carne, leite e força de trabalho. São bastante adaptados as condições climáticas do estado do Pará, produzindo muito bem nessas condições. No entanto, os produtores ainda carecem de animais testados para características produtivas. Sendo assim utilizamos a técnica de SSCP (Polimorfismo de conformação de fita simples) e marcadores SNP (Polimorfismo de nucleotídeo único), com a finalidade de caracterizar os 83 animais das raças murreh e mediterrâneo. Para o *DGAT1* encontramos as frequências alélicas de 0,741 para o alelo A, 0,253 para o alelo B e de 0,01 para o alelo C. As frequências genotípicas foram de 0,54 para o genótipo AA, 0,39 para o genótipo AB, 0,06 para o genótipo BB e de 0,01 para o genótipo AC. Para o gene *GH* encontrou-se apenas um genótipo. O gene *DGAT1*, mostrou considerável variação genética e detectou-se a presença de SNPs.

Palavras-chave: Marcadores. Produção. DNA. Leite. Genótipo.

ABSTRACT

The Buffaloes are domestic animals belonging to *Bubalus* genus, Bovidae family and Artiodactyla order. Provide meat, milk and workforce. Are quite adapted to the climatic conditions of the state of Pará, producing well in those conditions. However, producers still need tested animals for production characteristics. There were used the technique of SSCP (single-strand conformation polymorphism) and SNP markers (single nucleotide polymorphism), in order to characterize the 83 buffaloes from murreh and Mediterranean breeds. For the *DGAT1*, occurred allelic frequency of 0.741 for the allele A, 0.253 for the allele B and 0.01 for the allele C. The genotypic frequencies were 0.54 for the AA genotype, 0.39 for the AB genotype, 0.06 for the BB genotype and 0.01 for the AC genotype. For the *GH* gene was found only one genotype. The *DGAT1* gene showed considerable genetic variation and detects the presence of SNPs.

Key-words: Markers. Production. DNA. Milk. Genotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Quantificação de DNA em gel de agarose.....	23
Figura 02	Alelos encontrados utilizando a técnica SSCP para o gene <i>DGAT1</i>	23
Figura 03	Resultado de parte do sequenciamento dos diferentes alelos SSCP do gene <i>DGAT1</i> éxon-8. A) Presença do nucleotídeo citosina na região 136. B) Presença de heterozigose C/G na região 136. C) Presença do nucleotídeo guanina na região 136.....	24
Figura 04	Resultado de parte do sequenciamento dos diferentes alelos SSCP do gene <i>DGAT1</i> éxon-8. A) Presença do nucleotídeo citosina na região 256. B) Presença de heterozigose C/T na região 256. C) Presença do nucleotídeo timina na região 256.....	25
Figura 05	Resultado de parte do sequenciamento dos diferentes alelos SSCP do gene <i>DGAT1</i> éxon-8. A) Presença de heterozigose na região 277. B) Presença do nucleotídeo guanina na região 277.....	25
Figura 06	Genótipo encontrado utilizando a técnica SSCP para o gene <i>GH</i>	26

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

C – Celsius

DGAT1 – Diacilglicerol O-Aciltransferase 1

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – Dideoxinucléotídeo livre

GH – Hormônio do crescimento

mL – Micro litro

mM – Micro molar

ng – Nano grama

nM – Nano molar

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

QTL – Loco de característica quantitativa

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SSCP – Polimorfismo de conformação de fita simples

U.I. – Unidade Internacional

V – Voltagem

μ L – Micro litro

mRNA – RNA mensageiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DE VARIACÃO GENÉTICA.....	13
2.2 GENES CANDIDATOS E QTL (Locos de Características Quantitativas).....	15
2.3 GENE <i>DGAT1</i>	15
2.4 GENE <i>GH</i> (HÔRMONIO DO CRESCIMENTO).....	16
2.5 PRODUÇÃO DE LEITE NO DIA DO CONTROLE (PLDC).....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 ORIGEM DOS ANIMAIS.....	19
3.1.1. Extração e quantificação do DNA.....	20
3.1.2. Amplificação por PCR do gene <i>DGAT1</i> e <i>GH</i>	20
3.1.3. PCR-SSCP.....	21
3.1.4. Sequenciamento.....	21
3.1.5. Análises estatísticas.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA

Silva, Caio Santos

Caracterização de polimorfismos nos genes *DGAT1* e *GH* em búfalas (*Bubalus bubalis*) / Caio Santos Silva; orientador, José Ribamar Felipe Marques – Belém, PA, 2014.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Embrapa Amazônia Oriental, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

1. Bovino de leite– Pará. 2. Leite – Produção – Pará. 3. Polimorfismo – (Genética) - Pará. 4. Búfalo – Pará. I. Título

CDD – 22.ed. 636.2142

INTRODUÇÃO

Os búfalos são animais domésticos pertencentes ao gênero *Bubalus*, família Bovidae da ordem Artiodactyla. São de origem asiática, utilizados para produzir carne e leite para consumo humano (ABCB, 2013), além de fornecer força de trabalho. Devido suas características inatas, o búfalo é uma espécie que se adapta as diferentes condições edafo-climáticas, particularmente naquelas onde os bovinos e outras espécies tem apresentado dificuldade de expressar todo o seu potencial produtivo, ou seja, nas regiões subtropicais e tropicais do planeta (JORGE et al., 2006).

No Pará, os búfalos são criados com eficácia em sistemas integrados de terra firme com as áreas naturais, destacando-se os rebanhos das raças Mediterrâneo, Murrah e Jafarabadi (*Bubalus bubalis bubalis*), esta última em menor escala, juntamente com a raça Carabao (*Bubalus bubalis kerebau*).

A carne e o leite produzidos possuem alto valor nutritivo e comercial. Segundo Coura et al. (2011) a carne de búfalo apresenta características organolépticas e sensoriais similares à carne de bovinos, no entanto a carne bubalina apresenta menor valor de colesterol e calorias tendo ainda, mais maciez na idade ideal de abate, ou seja, aos dois anos. Por esses motivos pode-se dizer que a carne de búfalo é mais saudável que a carne bovina.

O mesmo autor afirma que o leite de búfala apresenta teores de lactose e proteínas semelhantes ao leite de vaca, no entanto o teor de gordura no leite de búfala é muito superior, o que o torna muito importante na indústria de processamento de produtos lácteos, como a produção de queijos dentre outros.

Entretanto, o número de rebanhos bubalinos selecionados zootecnicamente, com base em recursos da genética quantitativa, destacando-se os parâmetros genéticos, ainda é bastante reduzido, limitando a obtenção de ganhos genéticos expressivos, condizentes com o potencial da espécie fazendo-se, ainda, necessário o apoio adicional de técnicas da biologia molecular, para tornar o melhoramento genético dos búfalos no País em algo consistente.

O advento dessas técnicas, dentre elas o sequenciamento do genoma, tornou possível o estudo mais detalhado de genes envolvidos com características

quantitativas, o que permitiu avanços significativos nos programas de melhoramento genético.

Uma vantagem obtida com o sequenciamento é a identificação em larga escala de SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único). Esses têm permitido o desenvolvimento de novas metodologias e estratégias para o mapeamento de genes de interesse, pois são marcadores extremamente úteis para promover o mapeamento fino, cujo objetivo é delimitar a menor região genômica que contém um QTL (Locos de Características Quantitativas) (CARLSON et al., 2004), que são genes localizados no genoma e que têm efeitos genéticos aditivos, dominantes e/ou epistáticos significativos (LIU, 1998).

O estudo de genes, intimamente associados à síntese de leite em bubalinos e ao ganho de peso, tende a agregar valores com a utilização da seleção assistida por marcadores. Neste parâmetro, os genes *DGAT1* e o *GH*, associados à característica de produção e qualidade do leite, podem ter sua funcionalidade direcionada como marcadores de caracteres produtivos.

Entretanto, os polimorfismos e os efeitos destes na produção em búfalas ainda não estão claros.

Sendo assim o objetivo geral deste estudo é caracterizar polimorfismos nos genes *DGAT1* e *GH* e identificar polimorfismos de base única (SNPs). Tem-se por objetivos específicos identificar as frequências alélica e genotípica dos genes avaliados.

1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DE VARIAÇÃO GENÉTICA

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de metodologias da genética molecular e suas aplicações para auxiliar na resolução de problemas e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento e conservação e uso de recursos genéticos. As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais a outros estudos relativos à conservação e ao uso de bancos de germoplasma. Entre as vantagens dos marcadores moleculares, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da espécie em estudo ou a partir de cultura de células ou tecidos (FALEIRO, 2007).

Um marcador pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso (proteínas e caracteres morfológicos) ou de um segmento específico de DNA, cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas e possuem comportamento de acordo com as leis de Mendel (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O advento da técnica denominada de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) permitiu o surgimento de técnicas variantes, promovendo a criação de um grande número de tecnologias tendo como base a genética molecular. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genéticos moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Cada tecnologia apresenta vantagens e desvantagens. O uso de uma ou de outra vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

Do ponto de vista molecular, ocorrem três tipos principais de variações na forma, ou seja, polimorfismos na molécula de DNA: as regiões repetitivas, as inserções e deleções (Indels) e as alterações de uma única base (Polimorfismos de base única-SNP) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os polimorfismos ocorrem tanto em regiões codificadoras (éxons) como em regiões não codificadoras (íntrons) dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam na substituição de aminoácido na sequência protéica são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Sendo assim, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína (FORTES, 2007).

As variações alélicas na sequência de genes podem ser diagnosticadas pelo polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). Bannai et al. (1994), Ortí et al. (1997), Souza et al. (2003), explicam que o SSCP permite detecção de mutações de ponto ou variações nas sequências nucleotídicas, devido às mudanças conformacionais nas moléculas de DNA fita simples, durante a eletroforese em gel não desnaturante (ORITA et al., 1989). Entretanto, fatores como a quantidade de iniciadores, tamanho do fragmento a ser amplificado, posição e natureza da substituição no fragmento, composição da sequência do fragmento de DNA, influenciam na conformação das fitas simples (SARKAR et al., 1992).

Dentro da classe de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), os SNPs, são marcadores moleculares de DNA utilizados para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo (CHO et al., 1999).

Os polimorfismos de base única são fontes abundantes de variação genética, sendo gerados por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção e deleção. Esse tipo de marcador genético é muito interessante para estudos filogenéticos de evolução dentro da espécie (WOLTERS et al., 2000), mapeamento genético e, principalmente, na diferenciação de alelos do mesmo gene (MELLOTO; KELLY, 2001). Muitas vezes, a substituição de um único nucleotídeo leva a substituição de um aminoácido na proteína e, em consequência, à perda da funcionalidade dela e a modificação fenotípica (SOORI et al., 1999).

A principal vantagem dos SNPs, em comparação a outros marcadores, é a possibilidade de detecção de grande quantidade de polimorfismos entre alelos de

determinado gene. As principais desvantagens são a necessidade de conhecimento prévio de sequência de interesse e o custo/infraestrutura da técnica envolvido nas etapas necessárias ao sequenciamento dos diferentes fragmentos do DNA de interesse.

2.2 GENES CANDIDATOS E QTL (Locos de Características Quantitativas)

A utilização de genes candidatos tem por objetivo, estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características de produção em questão, na tentativa de pesquisar variações de genes específicos entre indivíduos que apresentam fenótipos diferentes (WOMACK, 1993). A estratégia do gene candidato tem como maior vantagem o fato de não ser obrigatório a genotipagem de um grande número de indivíduos, uma vez que espera-se que o polimorfismo estudado seja determinante direto da variação fenotípica.

O marcador genético pode ser usado para relacionar alelos de características quantitativas e informações sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa. A aplicação destes marcadores, tanto pela combinação dos alelos de duas ou mais raças, quanto pela seleção dos melhores alelos dentro de uma raça, para o estudo da variabilidade pode de maneira aplicada, ser correlacionado com características produtivas.

Por definição, Locos de Características Quantitativas (QTL) são regiões cromossômicas relacionadas à variação das características quantitativas. A hipótese empregada para a localização de um QTL é de que marcadores moleculares polimórficos estejam próximos e suficientemente ligados ao QTL, de forma que, na maioria da progênie de um indivíduo heterozigoto para o marcador, seja possível associar a variação na característica quantitativa de interesse com o genótipo do marcador, que será indicativo do genótipo do QTL (FALEIRO, 2007).

2.3 GENE *DGAT1*

O *DGAT1* (Diacilglicerol O-Aciltransferase 1), foi descrito por vários autores como sendo responsável pela síntese e metabolismo de triglicerídeos em várias espécies mamíferas (JING et al., 2007; CASES et al., 1998).

A enzima diacilglicerol aciltransferase 1 catalisa a reação final da síntese de triglicerídeos nos adipócitos, que são os principais componentes da gordura de depósito, inclusive no leite (CASES et al., 1998; KÜHN et al., 2004). Esta enzima se expressa em muitos tecidos, com mais altos níveis de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial (CASES et al., 1998).

Estudos com esse gene (GRISART et al., 2004; FURBASS et al., 2006; KUEHN et al., 2007) são exemplos clássicos de aplicação de mapeamento de associação. Coppieters et al. (1999), Grisart et al. (2004) e Kaupe et al. (2004) identificaram o gene *DGAT1* como sendo um QTL com efeito significativo na porcentagem de gordura, teor protéico e na produção de leite, localizado na extremidade centromérica do cromossomo 14 bovino (BTA14). O mesmo foi eleito candidato funcional para este QTL, pois está envolvido na catálise de triglicerídeos (KÜHN et al., 2004; RIPOLI et al., 2006) e por ter sido observado que na ausência deste gene, fêmeas de camundongo tiveram uma deficiência na lactação (SMITH et al., 2000).

O gene *DGAT1* foi avaliado para outros QTLs relacionados à síntese e deposição de gordura intramuscular e no acabamento de carcaça (THALLER et al., 2003)

2.4 GENE *GH* (HÔRMONIO DO CRESCIMENTO)

O GH (Hormônio do Crescimento) é um hormônio produzido pelos somatotrofos no lobo anterior da hipófise, é liberado na circulação e liga-se a receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de estimular o crescimento em diversas espécies animais (HERRINGTON; CARTER-SU, 2001).

O mesmo afeta uma grande variedade de parâmetros fisiológicos tais como controle de apetite, crescimento, composição corporal, envelhecimento e reprodução (BYATT et al., 1993), bem como a resposta imune (MARSH, 1992).

O hormônio de crescimento bovino possui efeito galactopoiético, o que é conhecido desde a década de 30. Seu mecanismo de ação envolve uma série de mudanças no metabolismo, direcionando mais nutrientes para a síntese de leite, sendo que o aumento na produção de leite é alcançado sem prejudicar a saúde do animal (ROCHE et al., 1992).

2.5 PRODUÇÃO DE LEITE NO DIA DO CONTROLE (PLDC)

A produção de leite no dia do controle é definida como sendo o somatório das quantidades de cada ordenha durante um período de 24 horas (PANDER et al., 1992; SCHAEFFER; JAMROZIK, 1996; FIRAT et al., 1997), podendo a mesma substituir a produção até 305 dias de lactação em avaliações genéticas de vacas e touros (FERREIRA et al., 2002).

Comparando os efeitos de meio ambiente que podem influenciar a produção de leite até 305 dias de lactação e os que podem influenciar a produção de leite no dia do controle conclui-se que são praticamente os mesmos efeitos. Por esta razão, os modelos para PLDC foram, inicialmente, definidos a partir dos tradicionalmente utilizados para P305, sendo que as diferenças principais estão na inclusão dos efeitos associados a cada controle mensal de produção (PTAK; SCHAEFFER, 1993).

Van Vleck e Henderson (1961), nos Estados Unidos, utilizaram 9.036 lactações de vacas da raça Holandesa, paridas entre 1957 a 1959, com o objetivo de estimar herdabilidades, repetibilidades, correlações genéticas e fenotípicas entre os controles mensais de produção de leite e a produção acumulada ao longo da lactação, bem como verificar se é possível obter progresso genético por meio da seleção, considerando-se os controles parciais em relação ao obtido na lactação completa. As herdabilidades estimadas aumentaram com o estágio da lactação, iniciando em 0.11, no primeiro controle, e alcançando 0.23, no quinto. Os valores entre o sexto e o oitavo controles permaneceram constantes em 0.21, aumentando novamente para 0.23, no nono e no décimo controles. Segundo esses autores, esses resultados sugerem que os primeiros e os últimos meses da lactação são mais sujeitos às variações temporárias de meio ambiente e que as produções do meio da lactação são mais influenciadas pelas diferenças genéticas e permanentes de meio existentes entre as vacas.

Pode-se obter maiores ganhos genéticos e, também, menores intervalos de geração quando se utiliza a produção de leite no dia de controle, uma vez que os animais podem ser avaliados no início de sua vida produtiva. Além disso, as confiabilidades dos valores genéticos serão maiores, quando se usa a produção de leite no dia do controle, uma vez que, há disponibilidade de mais informações pois,

os animais que não encerraram a lactação podem ser incluídos nas avaliações genéticas. Outra proposta válida para a utilização da PLDC é a redução do número de controles ao longo da lactação, utilizando-se apenas os controles do meio da lactação, visto que, as produções do meio da lactação são mais estáveis e correlacionadas com a produção até 305 dias. Nesses meses, os animais são menos influenciados pelas variações de ambiente, que no início e no final da lactação (FERREIRA et al., 2002).

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 ORIGEM DOS ANIMAIS

Foram avaliados 83 búfalas das raças murreh e mediterrâneo. Todas encontravam-se em lactação. São provenientes do Campo Experimental de Terra Alta – Pará, Embrapa Amazônia Oriental com coordenadas geográficas 1°05'37.75"S e 47°54'56.76"O e da Unidade de Pesquisa Dr. Felisberto Camargo em Belém – Pará, da Embrapa Amazônia Oriental, com coordenadas geográfica 1°26'28.29"S e 48°24'20.58"O.

3.1.1. Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de leucócito utilizando o protocolo descrito por Regitano (2001). As amostras foram coletadas em tubos a vácuo com capacidade de 5 ml contendo EDTA para evitar coagulação e conservadas a 4°C até a extração. Transferiu-se 2,5 mL do sangue para um tubo Falcon de 15mL. Adicionou-se 10mL de Solução A e vortexou-se até homogeneizar. Centrifugamos por 10 min a 700 xg. Descartamos o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 5mL de Solução A. Vortexou-se até dissolver completamente o pellet. Centrifugamos por 10 min a 700 xg. Ressuspendemos o pellet em 500µL de Solução A e transferimos para microtubos de 1,5mL. Centrifugou-se 5 min a 16.000 xg e descartamos o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 500µL de Solução B. Vortexamos até o pellet desprender do fundo do tubo. Incubamos a 55°C por 4-6 horas, vortexando periodicamente durante a incubação para que a dissolução do pellet fosse completa. Adicionou-se 210µL de TE (pH 7,6) e 240µL de NaCl 5M. Agitamos os tubos por inversão até formarem pequenos coágulos. Incubou-se em gelo por 10 min. Centrifugamos por 15 min a 16.000xg. Recolheu-se o sobrenadante dividindo-o em dois microtubos de 1,5mL limpos. Adicionou-se 1mL de etanol 100% (absoluto) gelado em cada tubo e misturamos por inversão. Centrifugamos por 15 min a 16.000xg. Descartamos o sobrenadante. Secou-se em papel. Adicionou-se 500µL de etanol 70% gelado. Centrifugamos por 5 min a 16.000xg. Descartamos o

etanol e secamos o pellet. Adicionou-se 250µL de TE+RNase (10µg de RNase por mL de amostra) e incubamos por 1h a 37°C.

Os DNAs extraídos foram quantificados em gel de agarose a 1,0%, a partir da comparação de concentrações crescentes de DNA bacteriófago lambda (50, 100 e 200ng/µL). Utilizaram-se 5µL de DNA, adicionados com 3 µL de tampão de carregamento e 3 µL de água destilada autoclavada. A interpretação do gel foi baseada na intensidade das bandas dos DNAs comparadas com as intensidades das bandas do DNA lambda.

A pureza do DNA foi avaliada utilizando-se o espectrofotômetro. As amostras foram avaliadas nas faixas de A260nm/A280nm e apresentaram taxa de 1,8, aproximadamente.

Após a quantificação, os DNAs foram diluídos a partir de uma alíquota da amostra total, com água ultrapura para a concentração de trabalho de 25ng/µL. As amostras diluídas e concentradas foram armazenadas a -20 °C.

3.1.2 Amplificação por PCR do gene *DGAT1* E *GH*

A região do gene *DGAT1*, éxon 8, foi amplificada por PCR usando os iniciadores (5'-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3') e (5'-GGAAGCGCTTTTCGGATG-3') (WINTER et al., 2002). A região do gene *GH*, éxon 5, foi amplificada usando os iniciadores (5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3') e (5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3') (YAO et al. 1996). Ambos iniciadores foram desenvolvidos para bovinos.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo água ultrapura, tampão de PCR (20 mM de Tris HCl (pH 8,0) e 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl₂, 1mM dNTP, BSA purificada (2,5 ng/ml), 1,3 µl de cada iniciador, 1 U.I. de Taq polimerase e 25ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti Thermal Cycler da Applied Biosystem. O programa utilizado na PCR consistiu de 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido por 45 segundos a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 57°C para o *DGAT1* e 61°C para o *GH* e 1 minuto 72°C, seguidos de mais 5 minutos a 72°C, para a completa extensão dos produtos amplificados.

3.1.3 PCR-SSCP

A técnica PCR-SSCP, foi utilizada para a verificação das variantes alélicas dos genes *DGAT1* e *GH*. Dois microlitros do produto de PCR foram misturados com 6µL de tampão de aplicação com formamida (0.05% xileno-cianol, 0.05% azul de bromofenol, 5.5 mM EDTA, pH 8.0, em formamida), desnaturados a 95°C por 10 minutos e imediatamente colocadas no gelo até a aplicação. Posteriormente as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida não desnaturante (acrilamida:bis-acrilamida 29:1). A eletroforese foi realizada com tampão TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3) a 8%, por 6 horas a 600V. O gel foi revelado utilizando-se nitrato de prata (BASSAM et al., 1991).

3.1.4 Sequenciamento

As amostras que apresentaram diferença de migração no gel de poliacrilamida não desnaturante, assim como três amostras dos diferentes genótipos detectados pelo PCR-SSCP, foram purificadas, utilizando-se o “PCR purification kit” (Qiagen) e sequenciadas no aparelho ABI 3130, Applied Biosystem na Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança - Pará.

3.1.5 Análises estatísticas

Para o cálculo das frequências alélica e genotípica utilizou-se o software GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A edição do eletroferograma gerado pelo sequenciamento foi realizada no programa Chromas Lite versão 2.1.1 software (Technelysium Pty Ltd 2013) e o alinhamento das sequências no programa Clustal Omega (McWILLIAM et al., 2013) usando a função multi-alignment. No alinhamento as sequências FJ014704 e DQ182702, referentes ao gene *DGAT1* e para o gene *GH* as sequências AF177288 e DQ307367 depositadas no GeneBank, foram utilizadas como referência para a identificação dos SNPs nas amostras estudadas.

A produção de leite no dia do controle foi o parâmetro utilizado para inferir a contribuição dos genótipos encontrados para os genes *DGAT1* e *GH* nos animais avaliados.

A média de produção, o desvio padrão, os valores máximo e mínimo, foram calculados utilizando o pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para extração do DNA mostrou-se rápido, eficaz e de fácil aplicação. O DNA extraído mostrou-se íntegro, sem quaisquer sinais de contaminação e em boa quantidade. A Figura 01 mostra a quantificação do DNA extraído de parte das amostras, sendo que nas três primeiras linhas encontram-se os DNAs Lambda de 50, 100 e 200, respectivamente.

Figura 01. Quantificação de DNA em gel de agarose



Os produtos de PCR apresentaram 412pb para o gene *DGAT1* e 404pb para o gene *GH*. Esses resultados foram similares aos encontrados por Yao et al.(1996) para o *GH* e por Winter et al. (2002) para o *DGAT1*, sendo que ambos avaliaram bovinos.

A técnica de SSCP, mostrou-se eficaz para avaliar polimorfismos em ambos os genes.

Para o gene *DGAT1* foram encontrados quatro genótipos, na Figura 02 vemos apenas 3, visto que o 4 genótipo só foi evidenciado após o sequenciamento, que corresponde ao alelo AC. Visualizamos o alelo AB, BB e AA respectivamente.

Figura 02. Alelos encontrados utilizando a técnica SSCP para gene *DGAT1*.



As frequências alélica e genotípica para o gene *DGAT1* estão representadas na Tabela 01.

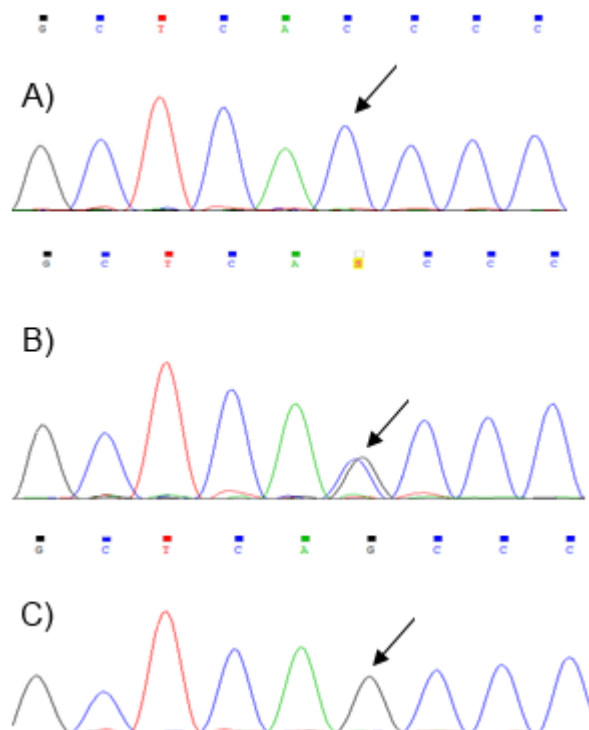
Tabela 01. Frequências alélica e genotípica para o gene *DGAT1*

Frequência alélica			Frequência genotípica			
A	B	C	AA	AB	BB	AC
0,741	0,253	0,006	0,54	0,39	0,06	0,01

Ashwin et al. (2012), avaliando vinte e dois búfalos das raças Murrah, encontraram frequências alélicas de 0,59 para o alelo A, 0,36 para o alelo B e de 0,05 para o alelo C. Os mesmos autores encontraram frequências genotípicas de 0,27 para o alelo AA, 0,55 para o alelo AB, 0,09 para o alelo BB e 0,09 para o alelo AC.

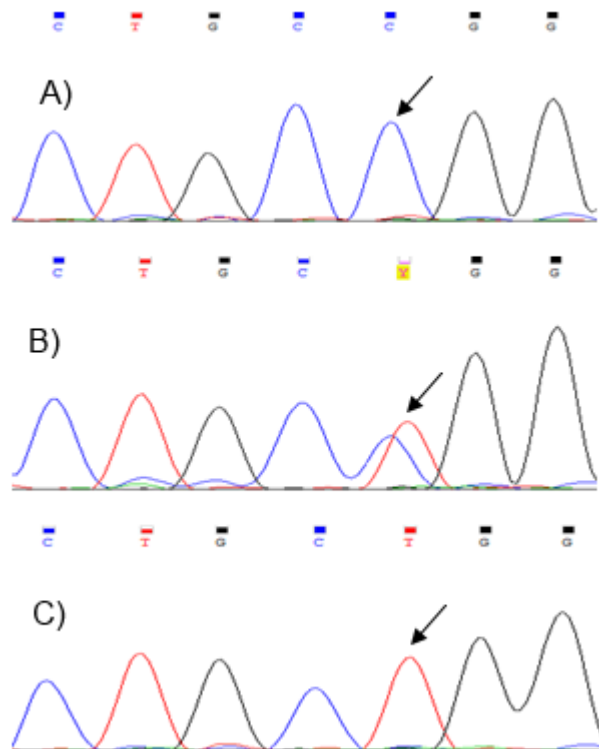
O sequenciamento do éxon 8, do gene *DGAT1*, evidenciou a presença de três SNPs nas amostras avaliadas como podemos observar nas figuras 03, 04 e 05.

Figura 03. Resultado de parte do sequenciamento dos diferentes alelos SSCP do gene *DGAT1* éxon-8.



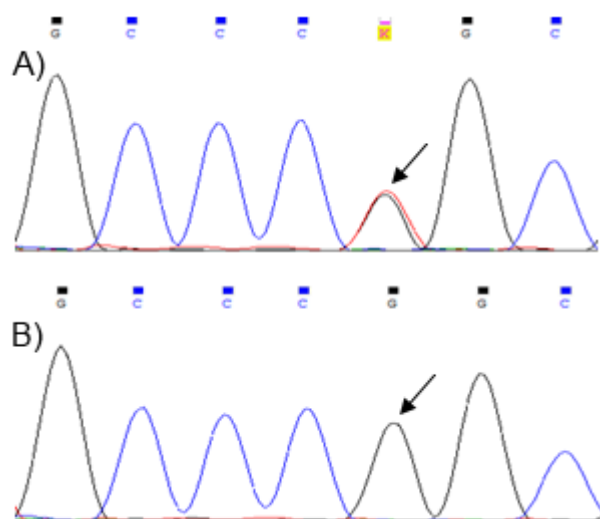
A) Presença do nucleotídeo citosina na região 136. B) Presença de heterozigose C/G na região 136. C) Presença do nucleotídeo guanina na região 136.

Figura 04. Resultado de parte do sequenciamento dos diferentes alelos SSCP do gene *DGAT1* éxon-8.



A) Presença do nucleotídeo citosina na região 256. B) Presença de heterozigose C/T na região 256. C) Presença do nucleotídeo timina na região 256.

Figura 05. Resultado de parte do sequenciamento dos diferentes alelos SSCP do gene *DGAT1* éxon-8.



A) Presença de heterozigose G/T na região 277. B) Presença do nucleotídeo guanina na região 277.

Ashwin et al. (2012) recentemente, encontram resultados similares para as regiões 136, transverso (pirimidina para purina) C—G, 256, transição (pirimidina para pirimidina) C—T e 277, transverso (purina para pirimidina) G—T. No entanto relatam uma mudança de base única C—A na região 75, o que não foi observado nos indivíduos avaliados. Os mesmos autores sugerem a influência desses polimorfismos no teor de gordura no leite. Sendo assim é necessário avaliar os animais amostrados, realizando-se a composição físico-química dos mesmos, a fim de verificar a contribuição desses SNPs no teor de gordura no leite.

Shi et al. (2012), avaliando búfalos das raças Murrah, encontraram também a substituição de base única C—T na região 256.

A substituição de uma lisina por uma alanina (AAG—CGC) na posição 201, no gene *DGAT*, relacionada à variação na porcentagem de gordura no leite e com grau de marmoreio na avaliação qualidade da carne (GRISART et al., 2004), em bovino,s não foi observada nos indivíduos avaliados.

A mutação encontrada nas regiões 136 C—G e 256 C—T, estão relacionadas ao alelo B. A mutação na região 277 G—T, é característica do alelo C.

Os SNPs identificados neste trabalho, ocorreram nos íntrons 7 e 8. Polimorfismos em intróns, afetam a funcionalidade dos genes para as enzimas, tais como óxido nítrico sintase endotelial (BURACZYNSKA et al., 2004) e a CYP1A2 isoenzimas do citocromo P450 (SACHSE et al., 1999). Uma vez que o gene *DGAT1* é também um gene de enzima, os SNPs aqui identificados podem influenciar a funcionalidade deste gene.

O gene *DGAT1* apresentou apenas um genótipo, ilustrado na Figura 07.

Figura 06. Genótipo encontrado utilizando a técnica SSCP para o gene *GH*.



AA

Yao et al. (1996), utilizaram a técnica SSCP para genotipar bovinos da raça Holstein, encontraram uma mutação de C—T no íntron 3 e uma mutação de A—C no éxon 5 do gene *GH*. O efeito dessas duas mutações corresponderia a um diferencial

de produção na ordem de 300 kg de leite, 8 kg de gordura e 7 Kg de proteína por lactação. No presente estudo analisamos o éxon 5 do referido gene, mas não encontramos a mutação encontrada por Yao et al. (1996), enfatizando que os mesmos analisaram bovinos.

As tabelas 03 e 04 mostram os valores encontrados para produção de leite no dia do controle e de cada animal avaliado e os SNPs encontrados.

Tabela 03. Valores de média de produção, desvio padrão e valores máximo e mínimo de produção, nos 83 animais avaliados.

N	Média (kg)	Desvio padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
83	4,33	1,63	1,50	9,37

Valores de alta produtividade foram considerados, para animais que produziam acima da média.

Tabela 04. Valores de produção e os genótipo encontrados para o gene *DGAT1*, para os 83 animais avaliados.

Animal	□ (kg)	Alelos
2918	3.53	AB
2964	1.95	BB
2922	4.00	AA
2973	3.20	AA
2920	1.65	AB
2968	5.47	AB
2977	3.72	AA

2974	3.20	AA
2926	3.20	AA
2924	4.93	AA
2976	6.30	AA
2927	5.90	AA
2970	4.00	AB
2981	4.20	AA
2980	4.40	AA
2978	2.00	AA
2979	4.90	AA
2481	9.16	AA
2525	7.75	AA
2569	3.20	AA
2630	3.20	AA
2635	6.30	AA
2669	6.00	AB
2674	4.40	AB
2722	4.60	AB

2690	4.82	AB
2717	3.53	AB
2719	1.65	AB
2730	4.20	AA
2733	2.65	AA
2737	3.00	AA
2757	3.96	AB
2734	4.00	AB
2756	1.50	AA
2746	4.85	AB
2755	6.08	AA
2769	4.90	AA
2775	9.37	AA
2774	3.90	AA
2768	5.40	AA
2759	3.08	AB
2779	3.91	AA

2787	3.60	AB
2801	2.94	AA
2791	7.32	AA
2862	4.38	BB
2808	5.00	AB
2809	4.82	AA
2810	6.28	AA
2815	1.95	AB
2816	7.04	AB
2817	3.04	AA
2818	3.35	AB
2821	1.65	AB
2835	3.76	AC
2827	5.00	AA
2830	3.58	AA
2837	2.08	AA
2844	6.44	AA

2849	5.00	AA
2850	2.22	AA
2852	4.26	AB
2853	4.08	AA
2854	5.36	AA
2855	3.39	AA
2856	8.40	AA
2868	6.30	BB
2873	4.82	AB
2874	5.00	AB
2878	4.34	AB
2879	4.00	AA
2896	5.40	AB
2897	4.85	BB
2904	5.80	AB
2907	3.91	AB
2911	3.96	AA

2913	2.00	AA
2930	4.60	AA
2943	3.35	AB
2947	3.02	BB
2957	3.39	AB
2959	3.91	AB
2961	3.90	AB

É certo que a seleção causa fixação dos genes desejados na população, pois altera a frequência gênica no sentido desejado. Entretanto, as características utilizadas nos programas de melhoramento genético são poligênicas, o que dificulta a observação da alteração na frequência dos genes. Para tanto, os efeitos da seleção sobre essas características são estimado por meio de mudanças na média da população.

No entanto a indicativos que o genótipo AA possa estar influenciando na quantidade da produção de leite nos animais avaliados, visto que podemos observar na Tabela 04, que as cinco maiores médias de produção por Kg, são de animais com este genótipo. Entretanto, são necessários mais estudos para verificar a influência do gene *DGAT1* na produção de leite em búfalas, bem como verificar a influência dos SNPs na composição físico-química do leite.

5 CONCLUSÃO

O gene *DGAT1*, mostrou considerável variação genética e identificou-se a presença de SNPs. O gene *GH* não apresentou polimorfismos nas amostras avaliadas. Faz-se necessário analisar outras regiões do referido gene, em busca de polimorfismos. Os resultados descritos aqui deverão ser úteis na determinação do papel que desempenha o *DGAT1* na regulação da síntese de gordura do leite, na melhoria da quantidade e qualidade do leite de búfala.

REFERÊNCIAS

- ABCB. **Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos**. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/carne.html>> acessado em 29 de novembro de 2013.
- ASHWIN A.R., et al. Identification of novel single nucleotide polymorphisms in the DGAT1 gene of buffaloes by PCR-SSCP. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p.610-613, 2012.
- BANNAI, M., et al. Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. **European Journal of Immunology**, v. 21, p.1-9, 1994.
- BASSAM, B.J; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p.80-83, 1991.
- BURACZYNSKA, M., et al. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism in patients with end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v .19, p. 2302-2306, 2004
- BYATT, J.C., et al. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. **American Journal of Physiology**, v. 264, p.986–992, 1993.
- CARLSON, C.S., et al. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. **Nature**, v. 429, p.446-452, 2004.
- CASES, S., et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy Science USA**, p.13018-13023, 1998.
- CHO, R.J., et al. Genome-wide mapping with biallelic markers in arabidopsis thaliana. **Nature genetics**, v. 23, p.203-207, 1999.
- COPPIETERS, W., et al. The great-grand-daughter design: a simple strategy to increase the power of a great-grand-daughter. **Genetic Research**, v. 74, p.189-199, 1999.
- COURA, R.A.N., et al. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFMG, 4., 2011, Congonhas – MG. **Anais...** Congonhas: Instituto Federal de Minas Gerais, 2011. v. 1, p 1-5.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, W.J., et al. Utilização da produção de leite no dia do controle na avaliação genética em gado de leite - uma revisão. **Archivos Latino americanos de Producción Animal**, v.10, n.1, p.46-53, 2002.

FIRAT, M.Z.; THEOBALD, C.M.; THOMPSON, R. Univariate analysis of test day milk yields os British Holstein-Friesian Heifers using Gibbs Sampling. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.47, n.4, p.213, 1997.

FORTES, M.R.S. **Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem.** 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, 2007.

FURBASS, R., et al. Alleles of the bovine *DGAT1* variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromossome 14 can stimulate gene expression. **Physiological Genomics**, v. 25, p.116-200, 2006.

GRISART, B., et al. Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 101, p.2398-2403, 2004.

HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p.252-257, 2001.

JING, Y., et al. Molecular Cloning and Single Nucleotide Polymorphism Detection of Buffalo *DGAT1* Gene. **Biochemical Genetics**, v. 45, p.611–621, 2007.

JORGE, A.M., et al. Caracterização Eletroforética da Degradação Miofibrilar do Músculo Semitendinoso de Bubalinos Murrah Confinados e Abatidos em Diferentes Idades. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa – PB. **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006. p 1-5.

KAUPE, B., et al. *DGAT1* polymorphism in *Bos indicus* e *Bos taurus* cattle breeds. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p.187-188, 2004.

KUEHN, C., et al. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-Acyltransferase (*DGAT1*) gene on milk production traits in German Holsestein cows. **Biomed Central Genetics**, v. 8, p.1-9, 2007.

KÜHN, C., et al. Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v. 167, p.1873-1881, 2004.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis.** New York: CRC Press Science, 1998. 611 p.

MARSH, J.A. Neuroendocrine-immune interactions in the avian species a review. **Poultry Science Reviews**, v. 4, p.129-167, 1992.

MCWILLIAM, H., et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**; 41(Web Server issue):W597-600, 2013.

MELLOTO, M.; KELLY, J.D. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-04, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p.508-517, 2001.

ORITA, M., et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p.2766-2770, 1989.

ORTÍ, G.; HARE M.P.; AVISE, J.C. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. **Molecular Ecology**, v. 6, p.575–580, 1997.

PANDER, B.L.; HILL, W.G.; THOMPSON, R. Genetics parameters of test day records of British Holstein-Friesian heifers. **Animal Production**, v. 55, n.1, p.11, 1992.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p.2537-2539, 2012.

PTACK, E.; SCHAEFFER, L.R. Use of test day yields for genetic evaluation of dairy sires and cows. **Livestock Production Science**, v. 34, n.1, p.23-34, 1993.

REGITANO, L.C.A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Embrapa. 2001.

RIPOLI, M.V.; CORVA, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Analysis of a polymorphism in the *DGAT1* gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p.287-290, 2006.

ROCHE, J.; QUIRQUE, J. Hormonal control of growth in beef cattle. **Beef Cattle Production**, p.151-167, 1992.

SACHSE, C., et al. Functional significance of a C – A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v 47, p.445-449, 1999.

SARKAR, G.; YOON, H.S.; SOMMER, S.S. Screening for mutations by RNA single-stranded conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n.4, p.871-878, 1992.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS. **SAS user's guide:** statistics, version 9.0. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2002.

SCHAEFFER, L.R.; JAMROZIK, J. Multiple-trait prediction of lactation yields for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n.11, p.2044, 1996.

SHI, D.S., et al. *DGAT1*, *GH*, *GHR*, *PRL* and *PRLR* Polymorphism in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Reproduction and Domestic Animal**, v. 47, p.328–334, 2012.

SMITH, J.A., et al. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beff cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. **Animal Genetics**, v. 31, p.306-309, 2000.

SOORI, V.A.; WATANABE, K.N.; VALKONEN, J.P.T. Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p.164-170, 1999.

SOUZA, C.S., et al. Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação do gene mitochondrial 16S RRNA em populações de *Mellipona rufilentris*. **Bioscience Journal**, v. 19, p.65-70, 2003.

TECHNELYSIUM Pty Ltd 2013. Chromas lite version 2.1.1. Acessado em: http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

THALLER, G., et al. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v. 34, p.354-357, 2003.

WINTER, A.K.; FREDHOLM, M.; THOMSEN, P.D. Variable (dG-dT)_n.(dC-dA)_n sequences in the porcine genome. **Genomics**. v. 12, p.281-288, 2002.

WOLTERS, P., et al. Nucleotide diversity at homeologous loci in wheat. In: PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 8., 2000, San Diego – CA. **Anais...** San Diego: PLANT AND ANIMAL GENOME, 2000. p 103.

WOMACK, J.E. Symposium: Bovine gene mapping: The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.1199–1203, 1993.

YAO, J., et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holstein. **Genetics**, v. 144, p.1809-1816, 1996.