

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A SELEÇÃO

José Fernando Garcia¹

RESUMO

O uso de biotecnologias da reprodução, acopladas aos programas de melhoramento genético, ganhou crescente posição de destaque nos sistemas de produção de ruminantes nas últimas décadas. A criopreservação de espermatozóides e a inseminação artificial, associadas à transferência de embriões e à produção de embriões *in vitro*, marcaram fase importante e decisiva para o melhoramento genético dos animais de produção. Mais recentemente, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular. A sexagem de embriões, os estudos de expressão gênica diferencial, a identificação de QTL (*Quantitative Trait Loci*) e de marcadores genéticos específicos, são partes integrantes da atual tecnologia que está a disposição da seleção animal. O presente artigo sumariza conceitos atuais sobre marcadores moleculares e as perspectivas de sua utilização em programas envolvendo seleção e melhoramento genético, incluindo o uso da transferência de embriões e tecnologias correlatas.

Palavras-chave: marcador molecular, PCR, transferência de embriões, fecundação *in vitro*, SNP.

INTRODUÇÃO

O Brasil segue a tendência mundial na busca de maior eficiência e qualidade na produção de alimentos destinados à população humana em constante crescimento. A pecuária moderna baseia-se na intensificação da atividade, tanto em relação a busca de qualidades produtivas dos animais, quanto ao aumento da velocidade do ciclo de produção, favorecendo a maior produção por área/ano (Milazzotto, 2001).

Para manter a competitividade comercial da produção de derivados animais num cenário de mercados internos e externos em desenvolvimento, a agroindústria brasileira vêm investindo em programas de melhoramento genético buscando aumentar a eficiência da produção, padronização dos animais e de seus produtos. Dentre das estratégias utilizadas nos programas de seleção podemos destacar: 1) o direcionamento de cruzamentos entre animais geneticamente provados, 2) a importação e disseminação de material genético (animais, sêmen e embriões) de rebanhos selecionados e 3) a utilização de cruzamentos entre raças aumentando a heterose, geralmente refletida no aumento de produtividade.

Como exemplo desses investimentos pode-se tomar o caso da bovinocultura. No cenário atual, os bovinos representam atividade pecuária de destaque no Brasil onde diversas raças das sub-espécies zebuínas e taurinas são prevalentes. Os animais zebuínos são possuidores de diversas vantagens em relação à produção nos trópicos quando comparados aos taurinos. É relatada maior resistência ao calor, aos ectoparasitas, aos hematozoários e maior adaptabilidade a alimentos com menor qualidade nutricional. Entretanto, como desvantagens são citadas a menor capacidade

¹Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP – Araçatuba e International Atomic Energy Agency (IAEA) Collaborating Centre on Animal Genomics and Bioinformatics

produtiva, qualidade inferior da carcaça e desenvolvimento tardio, comparativamente aos taurinos avaliados em seu ambiente natural (Koger, 1980; Pringle *et al.*, 1997; Lobo, 1998; Associação de Criadores de Nelore do Brasil; Associação Brasileira de Criadores de Zebu). Animais taurinos apresentam muitas características desejáveis, destacando-se entre elas a produção e qualidade do leite, a precocidade sexual e de qualidade e terminação de carcaça. Entretanto como desvantagens demonstram maior susceptibilidade a infestação por ecto e endoparasitas e menor tolerância ao calor. Buscando contornar os problemas apresentados pelos grupos raciais individualmente, muitos sistemas produtivos utilizam o cruzamento entre animais taurinos e zebuínos para aumentar a produção e produtividade dos animais.

Neste contexto, as biotecnologias da reprodução acopladas ao melhoramento genético ganharam crescente posição de destaque nos sistemas de produção de ruminantes. A criopreservação de espermatozóides e a inseminação artificial, associadas à transferência de embriões e à produção de embriões *in vitro*, marcaram fase importante e decisiva para o melhoramento genético dos animais de produção. Na última década, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular. A sexagem de embriões, os estudos de expressão gênica diferencial, a identificação de QTL (Quantitative Trait Loci) e de marcadores genéticos específicos, são partes integrantes da atual tecnologia que está a disposição da seleção animal (Garcia, 1995; Garcia, 2001, ISAG 2006).

Outras espécies de ruminantes que possuem menor número populacional, mas não menor importância, como a bubalinocultura, ovinocultura e caprinocultura, apresentam cada vez maior destaque no cenário das raças animais exploradas no Brasil, consolidando-se como contribuintes efetivos para o aumento do PIB nacional, através da seleção e melhoramento de raças nacionais bem como com a introdução de germoplasma importado. A mesma situação não pode ser observada no setor de suínos e aves onde a padronização fenotípica de animais chegou a ponto de estabilizar o “tipo” animal ideal que, via de regra, é comercializado por grandes empresas multinacionais de melhoramento genético, sendo o aprimoramento de sistemas de manejo, nutrição e sanidade de maior importância nessas espécies, em detrimento de programas de melhoramento genético locais.

CONCEITOS E FUNDAMENTOS

Os chamados marcadores moleculares, originados das variações no código do material genético (genoma) dos animais e que segregam pelas gerações segundo padrão de herança Mendeliana relacionada a características monogênicas ou que apresentam distribuição compatível com as esperadas em características poligênicas, são também denominados de marcadores genéticos (Ferreira e Grattapalia, 1998).

Os principais marcadores genéticos descritos são: 1) as inserções e deleções (Indels), 2) os polimorfismos de base única (SNP, do inglês: *single nucleotide polymorphism*) e 3) as regiões repetitivas. Quando estão localizados em regiões codificantes dos genes, os polimorfismos podem levar a alteração no aminoácido da seqüência protéica, nesse caso sendo chamados de polimorfismo “não sinônimo”, o que pode determinar diferenças na função protéica e conseqüente variação fenotípica. As variações em regiões não codificantes podem também alterar significativamente a expressão genética por diversos fatores tais como: promover processamentos alternativos do

RNA, geração ou supressão de códons de terminação/iniciação para a tradução ou alterar seqüências promotoras (Curi, 2004).

O elevado grau de polimorfismo, a inexistência de influência ambiental e a praticidade na análise (devido à variedade de materiais biológicos passíveis de serem utilizados e à simplicidade das técnicas envolvidas na análise) são algumas das vantagens da utilização desse tipo de informação para análise genética individual ou populacional de animais (Ferreira e Grattapalia, 1998).

Dentre os marcadores baseados em seqüências repetitivas estão os marcadores microssatélite, normalmente localizados em regiões não codificantes, com elemento repetitivo entre 1 e 6 pares de bases posicionados em estrutura concatenada (em *tandem*) e com número menor do que 100 repetições (Ferreira e Grattapalia, 1998). O polimorfismo de marcadores microssatélites pode ser determinado pela amplificação por PCR da região desejada, seguida de separação eletroforética, revelando padrões de banda variáveis de acordo com o número de elementos repetitivos (Neuenschwander, 2001).

Os marcadores microssatélites estão amplamente distribuídos em todo o genoma de eucariotos, apresentam elevado grau de polimorfismo, padrão de herança Mendeliana, codominância e facilidade na detecção por PCR e conseqüente determinação dos alelos e genótipos, sendo atualmente a ferramenta de eleição para execução de testes de paternidade (Page e Holmes, 1998).

A caracterização fenotípica dos animais, de forma simplificada, é determinada pela interação entre genótipo e o meio ambiente. Para estudar essa relação e suas conseqüências fisiológicas, é preciso fixar uma das variáveis para melhor analisar a outra. Mantendo os animais nas mesmas condições ambientais, é possível de forma segura, determinar a influência do genótipo no desenvolvimento animal (Lewontin, 2002).

Como exemplo clássico, desde a domesticação dos bovinos há aproximadamente 10.000 anos (Bruford *et al.*, 2003) e exploração destes animais como fonte de alimento e matéria prima, o ser humano vem selecionando os melhores indivíduos para características de seu interesse, concomitantemente à seleção natural. Com o conhecimento de que características fenotípicas podem ser herdadas pelos descendentes, mesmo muito antes da descoberta do papel do DNA como código genético, intensificou-se a seleção, primeiramente na área vegetal e posteriormente na área animal, buscando-se plantas e animais de maior interesse pela seleção daqueles considerados “superiores”.

Os sistemas de seleção clássica dependem da avaliação e mensuração das características fenotípicas, havendo necessidade de esperar o desenvolvimento natural do animal avaliado, para a realização das mensurações nos momentos em que os fenótipos se manifestam naturalmente. Essa abordagem possui um forte componente de subjetividade uma vez que está sujeita a erros humanos e estatísticos, apesar de ser a única base técnica disponível para o melhoramento genético até o presente.

Uma das vantagens do uso de marcadores moleculares em programas de seleção é a de apresentar o potencial de complementar a seleção clássica. As principais vantagens na sua utilização estão relacionadas à precocidade de avaliação dos animais para características específicas, uma vez que esta tecnologia emprega amostras de DNA, permitindo análises desde momentos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase embrionária pré-implantação, podendo ser inclusive incorporada a programas de produção *in vitro* e transferência de embriões, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética/produção animal (Garcia, 2001, Garcia e Porto-Neto, 2006). Além da objetividade envolvida na análise do DNA, outro importante benefício refere-se à possibilidade de seleção de características não observadas

tradicionalmente tais como aquelas que envolvem dificuldades técnicas de mensuração (precocidade sexual e de terminação de carcaça), elevado custo das análises (maciez/marmoreio da carne e resistência a ectoparasitas) ou por ser uma característica avaliada tardiamente (longevidade).

Em termos práticos, o principal foco na aplicação de tecnologias de biologia molecular relacionadas a avaliação de marcadores moleculares no melhoramento genético animal, consiste em identificar e analisar a variabilidade e correlação dos marcadores com os fenótipos de interesse. Esses marcadores podem ser classificados como indiretos (por exemplo, como na maioria dos casos em que marcadores microssatélite são relacionados a um QTL) ou diretos (como no caso dos polimorfismos em genes que codificam proteínas que influenciem nas características fenotípicas de interesse quer seja pela função da própria proteína quer seja por sua atuação como intermediário em vias metabólicas relacionadas ao fenótipo, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios de controle da função gênica) (Curi, 2004). Nesse último caso, em geral, atribui-se o efeito sobre o fenótipo a marcadores do tipo SNP.

A maior parte das características de interesse econômico apresenta padrão de manifestação quantitativo e conseqüentemente controlados por vários genes, cujos efeitos se somam para constituir o fenótipo manifestado efetivamente. Entretanto, acredita-se que certos genes apresentem papel majoritário na expressão dessas características, por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados por isso como genes principais (adaptado do termo em inglês: *major genes*) (Montaldo e Meza-Herrera, 1998).

As duas principais metodologias utilizadas para a identificação de marcadores relacionados a manifestação de características de interesse em programas de seleção são a abordagem do gene principal (ou gene candidato) e a da identificação de QTL através do mapeamento genético. Os estudos baseados em genes candidatos buscam indentificar polimorfismos diretamente nas regiões codificantes de um dado gene alvo ou em elementos regulatórios flaqueadores a essas regiões (Fitzsimmons *et al.*, 1998; Liefers *et al.*, 2002; Almeida, 2003). Já a metodologia baseada no mapeamento genético busca identificar polimorfismos relacionados a regiões genéticas de interesse, mesmo que não se conheça o gene diretamente envolvido no fenótipo em questão (Womack, 1993). Os marcadores mais utilizados atualmente para essa última abordagem são os microssatélites, pois graças às suas características peculiares previamente descritas, constituem-se em ferramenta ideal para a associação entre o fenótipo e o genótipo monogênico ou poligênico (Ihara *et al.*, 2004).

Embora a abordagem de caracterização do mapa genético envolva maior número de marcadores e aponte para maior número de regiões com potencialidade de relação positiva entre fenótipo e genótipo, a metodologia do gene candidato é mais assertiva por buscar a própria região de interesse que apresenta o efeito direto.

Recentes avanços biotecnológicos vêm permitindo a descoberta de marcadores genéticos aplicáveis à seleção e melhoramento em animais, sendo que em bovinos já foram descritos polimorfismos e variantes moleculares nos genes de diversos hormônios e receptores hormonais (Campagnari, 2002, Pringle *et al.*, 1997; Liefers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Di Stasio *et al.*, 2005; Curi *et al.*, 2005; Almeida, 2003) e em enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas como por exemplo, as da calpaína e a calpastatina relacionadas a maciez da carne (Barendse, 1997; Page *et al.*, 2002; Grisart *et al.*, 2004, Casas *et al.*, 2005). Esses achados têm elevado os genes envolvidos com a manifestação e controle dessas etapas fisiológicas como fortes candidatos a possuírem marcadores moleculares de utilidade para a seleção genética. Entretanto faz-se necessária a validação do efeito desses marcadores nas distintas

populações (raças), em especial em raças de bovinos zebuínos, pequenos ruminantes e bubalinos existentes no Brasil, objetivando a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos com essas manifestações, que ainda estão longe de serem simples e diretamente explicados.

PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES

Apesar de serem grandes os avanços observados na literatura especializada nos últimos 10 anos, as aplicações de marcadores de DNA em seleção e melhoramento genético nos ruminantes, diversamente do que vem ocorrendo com aves e suínos, tem se restringido apenas a iniciativas pontuais e isoladas tais como a sexagem de embriões, os testes de paternidade para fins de registro genealógico e a detecção de alguns marcadores individuais para doenças genéticas ou características funcionais em raças específicas.

Avanços oriundos das diversas iniciativas atualmente existentes no mundo para sequenciar o genoma bovino deverão gerar grande quantidade de dados em breve (expectativa para final de 2006). Além do descobrimento da totalidade de seqüências gênicas no genoma bovino, em projeto liderado pelo Consórcio Internacional do Sequenciamento do Genoma Bovino, a identificação de sítios polimórficos do tipo SNP em grandes quantidades, consistirá ferramenta para a busca de correlações entre genótipos e fenótipos com maior acurácia do que pelo uso de alguns poucos marcadores individuais (ISAG, 2006).

Nesse sentido, uma das iniciativas científicas mais promissoras da atualidade é o projeto BovHapMap (ligado ao Consórcio Internacional do Sequenciamento do Genoma Bovino), que segue os moldes do Projeto Genoma Humano e objetiva a identificação e análise dos diferentes perfis polimórficos de marcadores SNP em diversas raças bovinas (ISAG, 2006).

Espera-se que com essas informações seja possível aumentar a acurácia dos testes para correlação fenótipo e genótipo, e validar marcadores para características de produção em curto espaço de tempo, não somente nos bovinos, mas eventualmente com extrapolações nos demais ruminantes (bubalinos, ovinos e caprinos).

Especialmente no caso das raças zebuínas existentes no Brasil (bem como de seus cruzamentos), o presente momento é de crucial importância, pois é necessária a realização de testes de validação dos marcadores candidatos em populações controladas, o que consistirá da primeira fase dessa nova etapa tecnológica que está a caminho.

O resultado desses testes deverá fornecer critérios adicionais para a realização dos cruzamentos e acasalamentos entre animais, refletindo diretamente nas atividades práticas de transferência de embriões *in vivo* (TE convencional) e de produção de embriões *in vitro* (FIV).

Outro campo que surge nesse novo cenário diz respeito a adaptação da tecnologia de análise de marcadores moleculares diretamente ao embrião em fases pré-implantação, a partir da retirada e análise de biópsia embrionária. Apesar de tecnicamente exequível, esse processo ainda não encontra respaldo nos aspectos econômicos e práticos uma vez que o uso dos marcadores moleculares (principalmente aqueles relacionados às características funcionais) encontra-se ainda em estágio de validação. A exemplo da recente expansão no uso da sexagem de embriões bovinos por PCR, quando da sua incorporação às rotinas de produção de embriões *in vitro* após uma década da demonstração de sua exequibilidade (Garcia, 1995; Garcia, 2001, Alonso *et*

al., 2006), o mesmo poderá ocorrer com os marcadores funcionais, entretanto nenhuma previsão pode ser estabelecida nesse momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. E. M. Marcadores moleculares em sintenia com os genes da leptina e de seu receptor em bovinos: associação com parâmetros produtivos. Tese de doutorado. Genética e biologia molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- ALONSO, R. V. Hellu, J. A. A., ARDAIS, D. B., VISINTIN, J.A., GARCIA, J.F. Aplicação comercial em larga escala da sexagem de embriões produzidos *in vitro* por análise de DNA. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (Supl 1), 440, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU, World Wide Web (URL: <http://www.abcz.org.br>) (Agosto de 2005).
- ASSOCIAÇÃO DE CRIADORES DE NELORE DO BRASIL. World Wide Web (URL: <http://www.nelore.org.br>) (Agosto de 2005).
- BARENDSE, W. Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248, Patent US6383751, Disponível em <http://www.uspto.com>, 1997.
- BRUFORD, M.W.; BRADLEY, D.G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews*, v.4 p.900-910, 2003.
- CAMPAGNARI, F. Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio Folículo Estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – *campus* de Botucatu, 2002.
- CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE-JR C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, v.83, p.13-19, 2005.
- CURI, R.A. Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – *campus* de Botucatu, 2004.
- CURI, R. A.; DE OLIVEIRA, H. N.; SILVEIRA, A. C.; LOPES, C. R. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of *IGF1* and *GHR* on growth and carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics*, v.36, p.58-62, 2005.
- DI STASIO, L.; DESTEFANIS, G.; BRUGIAPAGLIA, A.; ALBERA, A.; A. ROLANDO. Polymorphism of the *GHR* gene and relationships with meat production and quality. *Animal Genetics*, v.36, p.138-140, 2005.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPALIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ed. EMBRAPA-CENARGEN: Brasília, 1998, 220p.
- FITZSIMMONS, C. J.; SCHMUTZ, S. M.; BERGEN, R. D.; MCKINNON, J. J. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome*, v.9, p.432-434, 1998.
- GARCIA, J.F. Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1995.
- GARCIA, J.F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. *Theriogenology*. v. 56, p. 1393-1399, 2001.
- GARCIA, J. F. e PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (Supl 1), 197-203, 2006
- GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIN, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMON, P.; FRÈRE, J.; COPPIETERS, W.; GEORGES, M. Genetic and functional confirmation of the causality of the

- DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. PNAS, v.101, p.2398-2403, 2004.
- IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K.; TAKEDA, H.; SUGIMOTO, M.; MIZOGUCHI, Y.; HIRANO, T.; ITOH, T.; WATANABE, T.; REED, K.M.; SNELLING, W.M.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C.W.; BENNETT, G.L.; SUGIMOTO, Y. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. Genome Research, v.14, 1987-1998, 2004.
- ISAG – International Society of Animal Genetics, 2006. Proceedings, Porto Seguro. Bahia, Brasil, 2006.
- KOGER, M. Effective crossbreeding systems utilizing Zebu cattle. Journal of Animal Science, v.50, p. 1215-1220, 1980.
- LEWONTIN, R. A tripla Hélice: gene, organismo e ambiente. Tradução José Viegas Filho – São Paulo: Companhia das Letras, 140 p., 2002.
- LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; BENKEL, B.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Assesment of a positional candidate gene *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. Journal Animal Science, v.82, p. 1-7, 2004.
- LIEFERS, S. C.; te PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; van der LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. Journal of Dairy Science, v.85, p.1633-1638, 2002.
- NEUENSCHWANDER, S. Structural and functional genomics in farm animals: a laboratory view point. Institut für Nutztierwissenschaften, Gruppe Züchtungsbiologie, 2001.
- LOBO, R.N.B. Genetic parameters for reproductive traits of zebu cows in the semi-arid region of Brazil. Livestock Production Science, v.55, p.245-248, 1998.
- MILAZZOTTO, M. P. Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2001.
- MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology, v.1, 83-89, 1998.
- PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLEN, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD, A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. Journal of Animal Science, v.80, p. 3077-3085, 2002.
- PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. Molecular evolution: a phylogenetic approach. 1ed. Blackwell Science Ltd, London, UK; 1998, 346p.
- PRINGLE, T.D.; WILLIAMS, S.E.; LAMB, B.S.; JOHNSON, D.D.; WEST, R.L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and age tenderness if Angus and Brahman crossbred steers. Journal of Animal Science, v.75, p. 2955-2961, 1997.
- WOMACK, J.E. The goals and status fo the bovine gene map. Journal of Dairy Science, v. 76, p. 219-226, 1993.