MAPEAMENTO DE QTL PARA CARACTERÍSTICAS DE RESISTÊNCIA A CARRAPATO, PESO AO NASCIMENTO E PESO A DESMAMA NO CROMOSSOMO 23 DE BOVINOS DA GERAÇÃO F2, CRUZAMENTO HOLANDÊS x GIR

KAREN PALLOTTA TUNIN

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro – 2004

MAPEAMENTO DE QTL PARA CARACTERÍSTICAS DE RESISTÊNCIA A CARRAPATO, PESO AO NASCIMENTO E PESO A DESMAMA NO CROMOSSOMO 23 DE BOVINOS DA GERAÇÃO F2, CRUZAMENTO HOLANDÊS x GIR

KAREN PALLOTTA TUNIN

Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Novembro – 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Tunin, Karen Pallotta
Mapeamento de QTL para características de resistência a carrapato, peso ao nascimento e peso a desmama no cromossomo 23 de bovinos da geração F2, cruzamento Holandês x GIR / Karen Pallotta Tunin. - - Piracicaba, 2004.
48 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Bovino 2. Carrapato 3. Cromossomo 4. Cruzamento 5. Fisiologia animal 6. Mapeamento genético 7. Melhoramento genético animal 8. Parasitologia veterinária 9. Resistência genética animal I. Título

CDD 636.2082

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedicatória

Á meus pais pelo suporte, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.
Ao Luiz Fernando, por tudo aquilo que representa para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pela orientação, ensinamentos e paciência.

Ao Dr. Mario Luiz Martinez, pela orientação e apoio.

Ao Dr. Marcos Vinicius Barbosa da Silva, pela ajuda, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Irineu Umberto Packer, pela ajuda, ensinamentos e apoio.

À Profa. Dra. Priscila Guimarães Otto, pelos anos de amizade, apoio e por me guiar no caminho da pesquisa científica.

À Dra. Érica Elias Baron, pela ajuda, companheirismo e amizade durante todo período da execução deste trabalho.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP pelos dias de convivência.

A todos meus amigos que, apesar da distância, sempre estiveram por perto me apoiando.

Aos meus cães pela paciência e companheirismo.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O carrapato *Boophilus microplus* e seus efeitos sobre a agropecuária	4
2.2 Resistência genética aos carrapatos: *Bos indicus* x *Bos taurus*	6
2.3 Complexo maior de histocompatibilidade dos bovinos (BoLA)	8
2.4 Melhoramento assistido por marcadores (MAS)	9
2.5 Mapeamento de QTL	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 População experimental	15
3.2 Coleta de sangue e extração de DNA	17
3.3 Coleta de dados fenotípicos	18
3.4 Escolha dos marcadores microssatélites	19
3.5 Preparo das reações de PCR	20
3.6 Análise dos produtos amplificados	21
3.7 Montagem do mapa de ligação	22
3.8 Mapeamento de QTL	23
4 RESULTADOS	24

4.1 Coleta dos dados fenotípicos 24
4.2 Escolha dos marcadores microssatélites 25
4.3 Preparo das reações de PCR 26
4.4 Análise dos produtos amplificados 27
4.5 Montagem do mapa de ligação 28
4.6 Mapeamento de QTL 30
5 DISCUSSÃO 37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42

LISTA DE FIGURAS

Página

1 Foto de gel de agarose mostrando teste de gradiente de temperatura (em °C) para o marcador BM 1905..... 26

2 Gel de agarose mostrando a amplificação do marcador CSSM24..... 27

3 Resultado do teste estatístico para o logaritmo da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa Embrapa..... 31

4 Resultado do teste estatístico para o logaritmo da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa MARC..... 32

5 Resultado do teste estatístico para o logaritmo da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa MARC..... 33

6 Resultado do teste estatístico para o logaritmo da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa MARC..... 33

7 Resultado do teste estatístico para peso ao nascimento utilizando-se o mapa Embrapa..... 34

8 Resultado do teste estatístico para peso ao nascimento utilizando-se o mapa MARC..... 35

9 Resultado do teste estatístico para peso a desmama utilizando-se o mapa Embrapa..... 36

10 Resultado do teste estatístico para peso a desmama utilizando-se o mapa MARC..... 36

LISTA DE TABELAS

Página

1 Média e desvio padrão da contagem de carrapatos, logaritmo da contagem de carrapatos, peso ao nascimento e peso aos 60 dias..... 25

2 Informações sobre os marcadores escolhidos..... 25

3 Temperatura de anelamento para cada marcador..... 27

4 Resultados gerais da genotipagem..... 28

5 Quantidade de meioses fornecidas por cada marcador..... 29

6 Mapa de ligação e taxa de recombinação dos marcadores..... 29

7 Comparação entre os mapas MARC e o mapa Embrapa..... 38

MAPEAMENTO DE QTL PARA CARACTERÍSTICAS DE RESISTÊNCIA A CARRAPATO, PESO AO NASCIMENTO E PESO A DESMAMA NO CROMOSSOMO 23 DE BOVINOS DA GERAÇÃO F2, CRUZAMENTO HOLANDÊS x GIR

Autora: KAREN PALLOTTA TUNIN
Orientador: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

RESUMO

Uma população experimental F2 foi desenvolvida a partir do cruzamento de quatro machos da raça Holandesa com vinte e oito fêmeas Gir, produzindo uma geração F1 com cento e cinqüenta animais, da qual quatro machos foram escolhidos baseados na sua fertilidade para acasalar com sessenta e oito fêmeas e produzir a geração F2 com aproximadamente quatrocentos indivíduos. Foram coletados dados fenotípicos para características de contagem de carrapatos, peso ao nascimento e peso a desmama para os animais da geração F2. Cerca de duzentos e noventa animais tiveram seu fenótipo medido para as características com exceção da contagem de carrapatos, onde somente cento e sessenta e sete animais foram medidos. As gerações parentais e F1 foram genotipadas para cinco marcadores microssatélites posicionados no cromossomo 23. Após a determinação do grau de informação dos marcadores, todos os animais da geração F2 disponíveis foram genotipados para os cinco marcadores. Com o resultado da genotipagem foi construído o mapa de ligação específico dos marcadores no cromossomo 23 para a população desenvolvida. Após o ajuste da característica de contagem de carrapatos pelo logaritmo da contagem e pela transformação rank, ambos

ajustes foram utilizados para mapeamento de QTL pelo método de regressão por mínimos quadrados ordinários, utilizando o programa QTL Express. Não foi encontrado nenhum QTL associado a nenhuma das características estudadas. O pequeno número de animais avaliados para a característica de contagem de carrapatos pode ter influenciado o resultado, bem como um melhor ajuste ou mais variáveis que complementem essa característica. Outras análises devem ser realizadas com essa população, tanto para complementar este estudo como para realização de outros estudos sobre características relativas a resistência a ecto e endoparasitas.

QTL MAPPING FOR TICK RESISTENCE, BIRTH WEIGHT AND WEIGHT AFTER SIXTY DAYS ON CHROMOSSOME 23 FROM F2 DESIGN BREEDING OF BOVINES HOLSTEIN x GIR

Author: KAREN PALLOTTA TUNIN
Adviser: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

SUMMARY

A F2 design population had been developed from the breeding between four male holstein with twenty eight female Gir, generating a F1 with one hundred and fifty animals, from these sample four male have been chosen based on their fertility for matching. They have been breed with sixty eight females, producing the F2 generation with about four hundred individuals. Phenotypic data has been collected for tick accounting, birth weight and weight after sixty days for individuals on F2. Over than two hundred and ninety animals had their phenotypic measured for those characteristics with the exception of the tick accounting. On this case, only one hundred sixty seven were measured. The parental and F1 generations were genotyped for five microsatellite markers positioned on chromosome 23. After the determination of the markers information degree, all the F2 animals available were genotyped for the five markers. Under the genotyping results was constructed the linkage map for this markers on chromosome 23. After the log transformation for tick accounting and the rank transformation both adjusts was used for QTL mapping by the regression method based on minimum ordinary least squares, using the QTL Express software, were not found any QTL associated for any studied characteristics. The small sample of animals used

for tick accounting could have biased the results. Other analyses must be taken over this population; not only to complete the present study, but also to create new sort of studies on characteristics related on ecto and endo parasites.

1 INTRODUÇÃO

Os países em desenvolvimento, que respondem por cerca de 60% da população mundial, estão situados na faixa tropical do globo e, de modo geral, apresentam baixos índices de desempenho no setor agropecuário, quando comparados aos países de clima temperado (Hammond, 1994). Certamente, nesses países, problemas como doenças e grandes infestações por endo e ectoparasitas prejudicam a produção dos animais, além de acarretar perdas de milhões de reais todos os anos com a prevenção, tratamento e, em alguns casos, até a própria morte do animal.

O Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais de bovinos do mundo, cerca de 170 milhões de cabeças, sendo aproximadamente 140 milhões exploradas para a produção de carne e 30 milhões para a produção de leite (Martinez et al., 2004). Segundo dados do IPEADATA (2004), a agropecuária representou 9,1% do PIB total do país em 2003, empregando 19% do pessoal ocupado (trabalhadores com registro em carteira), mostrando a importância desta atividade no cenário socioeconômico do país.

As infestações por ectoparasitas são responsáveis por perda produtiva da ordem de 26 milhões de arrobas de carne/ano e 4 bilhões de litros de leite/ano, causando um prejuízo da ordem de R$ 2,24 bilhões (Martinez et al., 2004). Outro prejuízo causado pelas infestações de carrapatos e bernes em bovinos, diz respeito aos danos causados ao couro, sendo que somente 8% do couro produzido no Brasil sejam de primeira qualidade, o que diminui seu valor. Na tentativa de se prevenir contra as perdas causadas pelos ectoparasitas, estima-se que no Brasil sejam gastos em torno de R$ 800 milhões em parasiticidas por ano, segundo dados da EMBRAPA - Gado de Leite (Martinez et al, 2004).

O melhoramento genético é uma alternativa eficiente e barata para a obtenção de animais mais tolerantes a parasitas, além de não provocar danos ao ambiente. Atualmente, uma das ferramentas utilizadas na exploração das informações a respeito da resistência genética a parasitas é a seleção assistida por marcadores (MAS), pois em situações em que se trabalha com características de baixa herdabilidade, por exemplo, este tipo de seleção mostra-se bastante interessante. Uma vez que se trabalha com características que possuem herdabilidade de moderada a alta, esta técnica se mostra como ferramenta interessante para este tipo de característica. Esta técnica pode ser utilizada para a seleção de animais resistentes tanto em rebanhos puros (Maillard et al, 2003) quanto em programas de cruzamentos como vem sendo utilizada por muitas empresas comerciais de melhoramento animal que estão começando a implementar a MAS em seus programas de melhoramento (Georges, 2001). Assim, a identificação de marcadores genéticos para a resistência a parasitas possibilita maior eficiência na seleção para esta característica, além de auxiliar no esclarecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na mesma.

Porém, características como resistência a doenças são, em geral, poligênicas, podendo resultar em complexas interações alélicas e não alélicas e são influenciadas também pelo ambiente (Regitano, 2004). Assim, essas características podem ser chamadas de multifatoriais, tornando seu estudo complexo e bastante difícil.

Os programas de melhoramento animal têm obtido bons resultados, porém estes só alcançaram resultados após vários anos de trabalho e se mostram mais eficientes quando realizados para características de perfil qualitativo. Como grande parte das características de interesse econômico possui um perfil quantitativo, a seleção assistida por marcadores torna-se uma opção bastante atraente, pois pode levar a resultados com bons ganhos genéticos mais rapidamente do que quando comparado as técnicas de melhoramento tradicionais (Khatkar et al, 2004).

Com o avanço da biologia molecular e o desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento do genoma, foi possível estudar com mais precisão os efeitos dos genes envolvidos nas características quantitativas nos organismos. A partir desse desenvolvimento, vários estudos demonstraram a possibilidade de mapeamento de QTL

(*Quantitative Trait Loci*), uma região do genoma onde podem estar inseridos um ou mais genes associados a características quantitativas.

No Brasil um estudo deste tipo vem sendo desenvolvido com bovinos pela EMBRAPA – em parceria com a Universidade de São Paulo e com a Universidade Federal de Viçosa. Com uma população formada a partir do cruzamento de fêmeas da raça Gir e machos da raça Holandesa por um delineamento experimental de F2, o estudo pretende identificar QTL para características de resistência a ecto e endoparasitas e resistência térmica ao calor. Esta dissertação tem como objetivos a montagem de um mapa de ligação e a investigação da presença de QTL no cromossomo 23 para características de peso ao nascimento, peso à desmama e resistência a carrapatos em bovinos de leite provenientes da população desenvolvida pela EMBRAPA – Gado de Leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O carrapato *Boophilus microplus* e seus efeitos sobre a agropecuária

O carrapato *Boophilus microplus* foi descrito pela primeira vez por Canestrini em 1887 e até os dias de hoje vem sendo um dos parasitas que mais prejudicam a bovinocultura no Brasil (Evans et al, 2000). Inicialmente este carrapato era tido como uma praga com algumas restrições climáticas, porém segundo esse autor, o *Boophilus microplus* pode ser considerado um "carrapato pantropical". Tal infiltração em condições climáticas aparentemente desfavoráveis, nos leva à conclusão de que este carrapato possui uma capacidade de adaptação excepcional (Hoogstral, 1973).

O ciclo biológico do carrapato *Boophilus microplus* apresenta uma fase parasitária de aproximadamente 21 dias na qual passa pelos instares de larva, ninfa e adulto, todos em um único hospedeiro.

A fase de vida livre inicia com a queda das fêmeas ingurgitadas e culmina quando as larvas eclodidas encontram um hospedeiro. Na fase de vida livre, a fêmea ingurgitada apresenta primeiro um período de pré-postura de 3 dias e morre após a postura. Em temperaturas ao redor de 28°C e alta umidade relativa (85%), a postura e a eclosão ocorrem em aproximadamente 18 dias. As larvas recém eclodidas migram para as pontas da vegetação onde podem localizar o hospedeiro pelo odor ou vibrações (Olsen, 1974).

No hospedeiro, as larvas se fixam em regiões corporais propícias para seu desenvolvimento, tais como posterior da coxa, perineal e perivulvar. Após sete dias de sua fixação ocorre a muda para ninfas e estas desenvolvem para adultos, com marcado

dimorfismo sexual, em aproximadamente oito dias. A fêmea, após o acasalamento, começa a alimentar-se do sangue do hospedeiro até o ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo, enquanto que o macho permanece no bovino à procura de novas fêmeas (Olsen, 1974).

Algumas observações interessantes à cerca do carrapato é o fato de ter se tornado uma das pragas mais importantes, inclusive em bovinos mestiços (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Na região de São Francisco de Paula, RS foi reportado pelos veterinários locais que, mesmo com bovinos mestiços, são necessários 4 tratamentos acaricidas por ano para prevenção de infestações massivas deste parasita (Evans et al, 2000).

No Brasil, o controle de carrapatos é feito principalmente pelo uso de substâncias acaricidas. Porém, o uso contínuo desses acaricidas tem promovido o aparecimento de carrapatos resistentes e, desta maneira, mesmo com o desenvolvimento de novas substâncias químicas de ação acaricida, novas cepas de carrapatos resistentes aparecem, se transformando num ciclo vicioso (Martinez et al, 2004a).

O uso de acaricidas não é um método economicamente viável de prevenção e controle de carrapatos (Pegram et al, 1991). Assim, o desenvolvimento de novas opções de prevenção deste ectoparasita se faz necessária e a procura por bovinos que sejam resistentes a este parasita é uma alternativa nessa busca por menores prejuízos.

Segundo Martinez et al (2004a), um bovino infestado com carrapatos e parasitado por vermes, se não for tratado, pode sofrer perdas de 18 a 47 kg de peso/ano. Segundo esse , um animal pode morrer devido à infestação se estiver parasitado por mais de 200 carrapatos por um período de seis semanas. Em fêmeas mestiças Holandês-Zebu, Furlong *et al.* (1996) verificaram que a queda da produção de leite por vaca foi de 23% quando estas apresentavam uma média de 105 carrapatos/vaca.

Os problemas causados pela infestação de carrapatos variam de acordo com a idade do animal, o nível de infestação e se o parasita em questão está atuando como vetor para outras enfermidades. Um bovino, que seja portador de uma alta carga parasitária, pode apresentar uma anemia leve a moderada e morte. Os carrapatos acarretam um aumento na taxa de morbidade e mortalidade durante o período de seca, onde as infestações tendem a ser maiores, além de retardar os resultados de terminação

de animais que se destinarão à venda. Porém o que mais preocupa em relação ao carrapato é sua atuação como vetor de outras enfermidades sanguíneas como a babesiose, anaplamose e a brucelose (Radostits et al, 2000).

Assim, tornam-se bastante compreensíveis e desejáveis que os esforços para que se encontre uma forma eficaz e economicamente viável de controle de carrapatos na bovinocultura brasileira. Desta forma, aumentaremos a produtividade de nosso rebanho e diminuiremos os gastos com produtos químicos que além de caros, deixam resíduos que cada vez mais são indesejáveis.

2.2 Resistência genética aos carrapatos: *Bos indicus* x *Bos taurus*

O mecanismo de resistência aos carrapatos pelos bovinos é um fenômeno complexo e não totalmente elucidado. Segundo Riek (1962), existem 2 mecanismos de resistência: o primeiro, já presente no animal quando ocorre a primeira infestação, é classificado como resistência inata e o segundo, conhecido como resistência adquirida, começa a ser evidenciado após a exposição do animal a algumas infestações por carrapatos.

A identificação de marcadores genéticos para a resistência a parasitas possibilitaria uma maior eficiência na seleção para esta característica, além de auxiliar no esclarecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência.

Em geral, o *Bos indicus* é mais resistente às doenças parasitárias do que os *Bos taurus*. De acordo com Thiesen (1979) e Lemos (1986), o gado indiano tem convivido há milhares de anos com o carrapato *Boophilus microplus* ocorrendo, provavelmente, uma eliminação natural dos animais mais sensíveis, o que permitiu maiores oportunidades reprodutivas para os animais geneticamente resistentes.

Utech *et al.* (1978) observaram em rebanhos Zebus, grande proporção de animais com alta resistência ao carrapato, enquanto Villares (1941) já verificara esta maior resistência do Zebu ao comparar o número de carrapatos encontrados em bovinos de diversas raças. Neste estudo foi observado que apenas 5% do total de carrapatos

encontrados eram provenientes de animais Zebu, 7% de raças nacionais ou crioulas e 88% de raças européias e que havia também diferença na resistência entre as raças indianas, sendo a raça Nelore mais resistente que a Gir e a Guzerá. Por outro lado, o gado europeu é menos resistente ao carrapato, provavelmente devido ao pouco contato com este parasita, mas existem raças com diferentes níveis de resistência. De acordo com Riek (1956) e Utech *et al.* (1978), a raça Jersey é mais resistente do que outras raças européias.

Lemos et al. (1985) estudaram resistência ao carrapato, sob infestação natural, em novilhas de diversos grupos genéticos que variavam de ¼ Holandês x Zebu até animais Holandês puro por cruza. Nesse estudo observou-se que a maior carga parasitária era diretamente proporcional ao aumento da proporção de genes do gado Holandês, sendo significativo este efeito aditivo, comprovando a menor resistência da raça européia.

As diferenças de resistência entre os *Bos taurus* e os cruzamentos *B.taurus* x *B.indicus* foram demonstrados por Byford *et al.* (1976) que observaram nos animais oriundos do cruzamento, em geral, uma resistência de moderada a alta. As estimativas de herdabilidade obtidas por vários autores, variando de 20 a 49% (Hewetson, 1968; Wharton *et al.*, 1970; Utech, 1979; Teodoro *et al.*, 1984 e Madalena *et al.*, 1985), sugerem que a seleção para resistência a carrapatos pode ser promissora.

Segundo Mascioli (1995), a estimativa de herdabilidade, por ser um valor particular para uma determinada característica, em uma população e tempo específicos, deve ser mensurada periodicamente a partir de amostras representativas.

Pesquisadores brasileiros estão firmemente empenhados em conhecer melhor a fisiologia e o complexo mecanismo da resistência a carrapatos, procurando solucionar esse grave problema dos trópicos e inserir essa característica em seus programas de seleção e melhoramento genético animal (Teodoro, 2004). Martinez et al (2004b), encontraram associação significativa entre o logarítimo da contagem de carrapatos e os alelos 10 e 42 do gene BoLA-DRB3.2 em bovinos oriundos do cruzamento de animais F1 Gir:Holandês.

2.3 Complexo maior de histocompatibilidade dos bovinos (BoLA)

Os genes do complexo maior de histocompatibilidade codificam glicoproteínas de superfície celular que acoplam e apresentam peptídeos antigênicos para as células T. O estudo da expressão dos genes que compõem o MHC é um componente essencial aos estudos de resposta imune e susceptibilidade a doenças (Ellis & Ballingall, 1999). Segundo esses autores, estudos detalhados do MHC numa grande quantidade de espécies têm revelado níveis surpreendentes de complexidade. Isso inclui mecanismos que resultam num aumento dos polimorfismos em locos individuais, diversificação da função de diferentes locos e múltiplas duplicações/deleções de genes que resultam composições variáveis dos haplótipos das classes I e II. Stear e Wakelin (1998) já reportaram a importância do MHC dos bovinos na resistência a parasitas. Segundo esses autores, essa resposta seria específica em relação aos parasitas não afetando outras respostas imunes e estaria relacionada ao modo com que ocorre a apresentação dos antígenos às células T, responsáveis pela iniciação da resposta imune.

O mecanismo exato de como isso acontece ainda permanece desconhecido, porém as evidências disponíveis sugerem que esta ampla gama de genótipos e fenótipos produzidos pelo MHC está envolvida com a pressão de seleção para o desenvolvimento e manutenção de populações melhor capacitadas a conviver com patógenos endêmicos.

A possibilidade da manipulação das respostas imunes com o propósito de melhorar a resistência a doenças infecciosas fez com que imunologistas e geneticistas se interessassem no estudo do MHC nos bovinos (Fries & Ruvinsky, 1999).

O sistema BoLA (Bovine Lymphocite Antigen) está localizado em dois segmentos distintos do cromossomo 23 dos bovinos (BTA23). As regiões do BoLA classe IIa, classe II e classe I estão localizadas a 35 cM do centrômero, enquanto que a região da classe IIb está localizada entre 15-30 cM do centrômero (Band et al., 1998). As moléculas da classe I são expressas em todas as células nucleadas e sua principal função é apresentar peptídeos para os linfócitos T $CD8^+$, que são responsáveis pela

morte das células infectadas por vírus e células neoplásicas, também conhecido como resposta imune celular. Já as moléculas da classe II são responsáveis pela apresentação dos antígenos produzidos por parasitas do organismos que são levados até células especializadas (linfócito T $CD4^+$) que uma vez estimuladas, ativam macrófagos e células B para gerarem resposta inflamatória e a produção de anticorpos, respectivamente, também conhecidas como resposta imune humoral (Fries & Ruvinsky, 1999).

2.4 Seleção Assistida por Marcadores (MAS)

O melhoramento genético é uma alternativa eficiente e barata para a obtenção de animais mais tolerantes a parasitas, além de possuir caráter permanente e não provocar danos ao ambiente.

Atualmente a ferramenta preferida na exploração das informações a respeito de características de interesse econômico é a seleção assistida por marcadores (MAS) e muitas empresas comerciais de melhoramento animal estão começando a implementar a MAS em programas de melhoramento de rebanhos (Georges, 2001).

Para situações em que se exploram raças de média a alta resistência, a seleção dos indivíduos por meio de um índice de seleção que combine características produtivas e resistência aos carrapatos pode levar a respostas altamente satisfatórias (Teodoro, 2004). Ainda segundo este autor, a introgressão de genes de efeito maior nestas raças de alta resistência aumentará a resposta à seleção. O uso de marcadores de genes anticarrapatos será de grande importância no aumento da precisão na identificação dos indivíduos resistentes e para diminuir possíveis gastos com indivíduos não-desejáveis. No futuro, a combinação do uso de indivíduos altamente resistentes aos carrapatos e das vacinas anticarrapatos certamente levará à eliminação do uso dos acaricidas.

2.5 Mapeamento de QTL

O mapeamento de QTL, isto é, a detecção, localização e estimativa do efeito de regiões do genoma associadas a uma característica de herança quantitativa, demanda

número muito grande de animais com seu fenótipo de interesse determinado. Este número depende da magnitude do efeito que se deseja identificar, da herdabilidade da característica, do delineamento experimental escolhido, entre outros fatores. Este requisito é particularmente limitante em bovinos, que possui custos de produção e manutenção bastante elevados (Regitano, 2004).

Devido as novas técnicas de reprodução utilizadas atualmente nos rebanhos comerciais de gado leiteiro já é possível conseguir grande número de progênies de um mesmo touro, tornando esses rebanhos muito úteis para o mapeamento de QTL.

Segundo Georges & Andersson (2003), o gado leiteiro possui vantagem no mapeamento de QTL, devido ao fato de que nas fazendas há intensa anotação de dados referentes a avaliações fenotípicas tais como medidas de qualidade de leite, saúde do animal, avaliações morfométricas e da anotação de informações do pedigree e de manejo, principalmente nos países de maior desenvolvimento. Ainda, segundo esses mesmos autores, o mapeamento de QTL em animais é beneficiado pelo reduzido tamanho efetivo das populações, que leva à redução na complexidade das características em termos de heterogeneidade de alelos, aliada à maior extensão dos blocos de desequilíbrio de ligação, em comparação com outras espécies.

Segundo Rocha et al (2002), a detecção de QTL requer três estágios essenciais: (1) coleta acurada de dados fenotípicos dentro da população desenvolvida; (2) coleta acurada dos dados de genótipo (através de marcadores moleculares) da população; e (3) análise estatística correlacionando os dados de fenótipos com os dados de genótipos, refletindo a organização da população e sua estrutura.

Para a identificação de QTL podem ser utilizados diversos delineamentos experimentais. Por se tratar de animais, são utilizados delineamentos de cruzamentos entre animais não aparentados, uma vez que a endogamia pode trazer como conseqüência o aparecimento de genes deletérios em homozigose, sendo que alguns deles podem ser letais. Entre os delineamentos utilizados em animais podemos citar os delineamentos de meios irmãos, delineamento de netas e F_2.

No delineamento de meio-irmãos, também conhecido como delineamento de filhas, há necessidade de genotipagem, além do touro, de todas as suas filhas, bem como

mensurar seus registros fenotípicos, o que pode tornar o experimento caro. Duas situações são mais comuns neste tipo de delineamento, a primeira onde são analisados os registros de meias-irmãs, filhas de um único touro, e a segunda, onde o conjunto de dados disponível refere-se às famílias de meias-irmãs, filhas de vários touros (Silva, 2002).

No delineamento experimental de netas, touros heterozigotos (chamados de avós) têm os filhos genotipados para o marcador e suas netas avaliadas para as características fenotípicas. Nesse delineamento infere-se que as vacas são acasaladas ao acaso com os touros heterozigotos e com seus filhos. Assim, apenas a metade das netas receberá o alelo paterno, e a esperança do contraste entre os grupos de progênies (netas) é apenas a metade do que é no delineamento de filhas. Porém, o número maior de registros de desempenho avaliado pode compensar a redução do valor do contraste, diminuindo seus respectivos erros-padrão. Outra vantagem é a utilização de um menor número de animais genotipados, o que diminui do custo, além de facilitar a colheita de amostras de sangue ou sêmen dos filhos do touro, que geralmente estarão concentrados em centrais de inseminação artificial, enquanto suas filhas estarão espalhadas por diversas fazendas (Weller et al, 1990).

Em rebanhos de gado de leite, onde grande número de famílias de meios-irmãos são rotineiramente produzidas por inseminação artificial e as filhas individuais são separadas e distribuídas para diversas fazendas e ambientes, podem ser geradas informações suficientes para permitir uma seleção efetiva da resistência a doenças pelo fenótipo. Porém, o acesso a essas informações é muito difícil, uma vez que a coleta de dados de resistência a parasitas e doenças, não é fácil. Assim, para mapear locos de resistência, cada indivíduo da população experimental é avaliado para a característica de resistência genética (a doenças e/ou parasitas) e também é genotipado com marcadores que cobrem todo o cromossomo de escolha.

O desenho experimental de F_2 promove o desequilíbrio de ligação necessário para a identificação de QTL quando são cruzadas duas subespécies, como, por exemplo, *Bos taurus* e *Bos indicus*. Este delineamento é o que oferece melhor poder de detecção em relação ao número de animais disponíveis, quando este número não é tão expressivo.

Por este delineamento também é possível a separação dos efeitos aditivos e de dominância dos QTL encontrados.

Os QTL só serão detectados quando as duas populações diferirem na freqüência dos alelos dos QTL. O delineamento experimental de F_2 é mais usado quando o objetivo é cruzar duas populações divergentes e identificar os indivíduos superiores resultantes, ou quando o objetivo é introduzir um gene de interesse, presente em uma das populações. A possibilidade de identificar QTL nas populações em equilíbrio de ligação entre o marcador e o QTL, foi discutida por Soller (1990).

Segundo Silva (2002), o princípio da identificação de QTL ligados a marcadores é conceitualmente simples: animais são genotipados para o loco do marcador escolhido e têm seu fenótipo medido para a característica que se deseja estudar. Existindo diferença entre as classes de genótipos dos marcadores, é possível supor a existência de QTL ligados. Ainda, segundo esse autor, os locos de marcadores podem ser considerados isolada ou simultaneamente, e o número de QTL detectados por ligação com os marcadores será sempre uma subestimativa do número de locos. Isso porque dois QTL intimamente ligados podem aparecer como um único QTL, se eles estiverem em associação, isto é, os alelos relacionados ao aumento do valor para a característica deveriam estar em homozigose em uma das linhagens parentais, enquanto os alelos relacionados à diminuição do valor da característica deveriam estar fixados na outra. Por outro lado, podem não ser detectados se estiverem em repulsão, ou seja, se cada linhagem tiver aumento em relação a um determinado alelo e diminuição em relação a outro.

Três aspectos básicos devem ser considerados no planejamento de um programa para mapear e identificar os locos que contribuem para a resistência à parasitas: 1) a população e a escolha de marcadores em desequilíbrio de ligação com os genes da característica estudada; 2) o modelo de análise dos dados que permita o máximo de resolução para identificar a associação entre a medida da característica e 3) o genótipo do marcador (Rocha et al, 2002). Esses aspectos devem ser estudados, procurando-se na literatura o que já foi realizado e assim planejar de maneira mais eficiente um programa de mapeamento que melhor se ajuste ao que se deseja estudar.

O mapeamento para detecção de QTL utiliza marcadores genéticos que cobrem todo o cromossomo de interesse para identificar genes que afetam características quantitativas. Para tal é necessário estabelecer, ou escolher, uma população em que as características de interesse estejam segregando, utilizando um delineamento apropriado para esse fim. Com a utilização de métodos estatísticos apropriados é possível identificar o QTL, bem como estimar sua posição e efeito por meio da associação entre marcadores e as características de interesse econômico. A vantagem desse procedimento é que não exige conhecimento prévio dos genes envolvidos na expressão do fenótipo de interesse. Além disso, há grande probabilidade de sucesso, desde que o delineamento experimental, o número de animais e a distribuição dos marcadores sejam adequados. Esse procedimento pode revelar QTL que não seriam identificados por genes candidatos, como é o caso do efeito quantitativo devido a pleiotropia (Rocha et al, 2002).

A utilização de marcadores moleculares para genes de resistência ou susceptibilidade às doenças infecciosas foi revisada por Soller e Anderson (1998). Esses autores concluíram que genes que determinam resistência a doenças (como por exemplo, parasitoses) podem ser acompanhados por meio da identificação genética, ou por marcadores ligados a eles.

Apesar das dificuldades observadas no mapeamento de QTL em ruminantes, várias características já tiveram parte de sua variação atribuída à regiões do genoma dos bovinos. No cromossomo 23 dos bovinos, diversos estudos já foram e estão sendo realizados na tentativa de mapeamento de QTL. Zhang et al (1998) mapearam um QTL no cromossomo 23 para a característica de taxa de gordura no leite numa população desenvolvida para este fim sob um delineamento experimental de netas. Em uma população de bovinos da raça Finnish Ayrshire, utilizando o delineamento experimental de F_2, Elo et al (1999) mapearam QTL para porcentagem de proteína no leite, peso vivo, mortalidade de bezerros ao nascimento, velocidade de lactação e freqüência de tratamentos veterinários todos com significância de menos de 5%. Plante et al (2001) estudaram os diversos cromossomos de bovinos da raça Holandesa de uma população desenvolvida por eles e não houve sugestão da presença dos QTL encontrados pelos

autores anteriormente citados no cromossomo 23; todavia, houve coerência nos resultados obtidos com outros cinco cromossomos também estudados por esses autores.

Kim et al (2003) estudou o mapeamento de QTL em cromossomos de bovinos mestiços obtidos por meio do cruzamento de animais da raça Angus (*Bos taurus*) e da raça Brahman (*Bos indicus*) em um delineamento experimental de F_2; um QTL de efeito pleitrópico sobre o peso ao abate e o peso da carcaça quente foi localizado no cromossomo 23. Li et al (2004) estudaram uma linhagem comercial de bovinos de corte de uma empresa canadense, na tentativa de mapear QTL associados à característica de capa de gordura, sendo encontrado um QTL positivo e significativo no cromossomo 23 na região compreendida entre 45,1 a 50,9 cM deste cromossomo. Estudando QTL para características que afetam a produção de leite, saúde e características reprodutivas em bovinos da raça Holandesa, Ashwell et al (2004) encontraram um QTL significativo para contagem de células somáticas, característica que além de se relacionar com a qualidade do leite, pode ser relacionada com a saúde do animal, a 50 cM do cromossomo 23.

Khatar et al (2004), revisaram 55 trabalhos publicados sobre identificação de QTL em diferentes populações para características de interesse econômico (como produção de leite, taxa de gordura, etc.) e a partir de um estudo de meta análise de todos os trabalhos, definiram algumas regiões consenso para diversos cromossomos, porém nada foi encontrado para estas características no cromossomo 23.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População experimental

Os animais do experimento foram obtidos a partir do cruzamento de bovinos da raça Holandesa e Gir, seguindo o delineamento experimental de F2. Essa população foi desenvolvida no Campo Experimental Santa Mônica, pela Embrapa Gado de Leite, localizado em Valença, RJ.

Para isto foram utilizadas 28 fêmeas Gir (submetidas à superovulação) inseminadas com sêmen de quatro touros da raça Holandesa e os embriões transferidos para fêmeas receptoras. Como receptoras foram utilizadas cerca de 300 fêmeas Holandês x Gir, com "grau de sangue" variando de ½ a ⅞, entre novilhas e vacas adultas em lactação. Estes acasalamentos foram repetidos com a finalidade de se obter cerca de 150 F_1. Destes 150 indivíduos F_1 (machos e fêmeas), apenas 4 machos foram escolhidos baseados na sua fertilidade, para serem pais da nova geração de F_2. Sessenta e oito fêmeas F_1 foram acasaladas com cada um dos quatro touros, para construírem 4 famílias (baseadas nos machos), evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. Cada uma das famílias produziu, por meio da superovulação e transferência de embriões, cerca de 100 animais F_2. No total foram obtidos cerca de 400 indivíduos F_2 (200 machos e 200 fêmeas), ou seja, cerca de 100 animais por reprodutor.

Os animais foram manejados, em suas diferentes faixas etárias e condição fisiológica, como descrito a seguir.

As vacas em lactação eram ordenhadas duas vezes por dia, sendo fornecido concentrado uma vez durante a primeira ordenha, de acordo com a produção de leite: as vacas que produziam até 8 kg de leite, não recebiam concentrado; de 8 a 14 kg, recebiam

2 kg de concentrado/dia; de 14 a 18 kg, recebiam 4 kg de concentrado por dia; acima de 18 kg, de leite eram fornecidos 6 kg de concentrado. O volumoso na época das águas era oferecido sob sistema de pastejo, e na época da seca, pastejo mais cana e uréia. A secagem das vacas era realizada 60 dias antes do parto ou quando a produção era inferior a 3 kg de leite/dia e, após a secagem, os animais recebiam o mesmo manejo das novilhas. A inovulação era realizada no primeiro cio 60 dias após o parto.

As novilhas permaneciam em regime exclusivo de pasto e eram inovuladas com peso acima de 300 kg.

Cerca de 30 dias antes do parto, as novilhas e as vacas recebiam 2 kg de concentrado/dia e manejo semelhante ao das vacas em lactação, sendo encaminhadas, na véspera do parto, para o piquete maternidade onde eram observadas dia e noite.

Os bezerros, logo após o nascimento, eram acompanhados e induzidos a mamar o colostro, ou então, este era fornecido em balde durante as primeiras seis horas de vida. O bezerro permanecia junto à mãe durante as primeiras 24 horas de vida para ter acesso livre ao colostro, período no qual são pesados. Em seguida, eram levados para abrigos individuais onde recebiam:

- 1 a 3 dias: colostro 2 vezes ao dia, de preferência da mãe;
- 4 a 14 dias: 2 litros de leite pela manhã e 2 litros de leite à tarde mais concentrado com 18% de proteína, à vontade;
- 14 a 56 dias: 4 litros de leite à tarde, mais concentrado com 18% de proteína, à vontade;
- 56 a 70 dias: ainda nos abrigos individuais, os animais recebiam apenas o concentrado com 18% de proteína;
- 71 a 180 dias: eram fornecidos 2 kg de concentrado/dia com 16% de proteína mais pastagem. Nessa fase, os animais eram levados para piquetes em grupos de, aproximadamente, 10 animais.
- 181 a 300 dias: fornecimento de 1 kg de concentrado/dia com 16% de proteína, pastagem e suplementação de volumoso, com cana mais uréia, na época da seca. Nesta categoria eram formados grupos com cerca de 50 animais cada.

Durante todo período de criação, os animais não eram controlados contra os ecto e endoparasitas.

Para o presente estudo, foram genotipados 272 animais F_2, pois até o momento da análise dos dados eram estes os animais com DNA disponível. Por esta razão também não foram utilizadas as informações quanto aos genótipos de todos os parentais, uma vez que não havia informações fenotípicas completas para todas as famílias.

3.2 Coleta de sangue e extração de DNA

Amostras de sangue de todos os animais (mães gir, mães F_1, pais F_1 e indivíduos F_2) foram coletadas para a extração de DNA. No caso dos pais holandeses (4 touros) o DNA foi extraído do sêmen, tendo-se em vista que o sêmen foi importado e não havia disponibilidade do sangue destes animais.

O DNA das amostras de sangue foi extraído no Laboratório de Biotecnologia Animal da EMBRAPA – Gado de Leite, conforme protocolo de Hallerman *et al.* (1988). Amostras de aproximadamente 30 ml (com 0,5% EDTA) foram centrifugadas e o plasma retirado. As células vermelhas do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl2, 10 mM NaCl), e o resíduo celular peletizado por centrifugação (2.500 rpm, 10 mim). A desintegração foi repetida três vezes ou até que um precipitado branco foi obtido. As células brancas do sangue foram recolocadas em suspensão e incubadas num tampão de digestão (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,02% SDS, com 3 mg proteinase K por amostra) a 42ºC até o dia seguinte. As amostras foram extraídas duas vezes em fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), duas vezes em clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e então precipitadas em etanol gelado. O DNA foi solubilizado em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0) e congelado até a hora do uso. Um protocolo semelhante, apenas omitindo o passo de desintegração das células vermelhas e outras pequenas alterações, foi utilizado para a extração de DNA do sêmen (Zadworny e Kuhnlein, 1990).

Todos as amostras de DNA foram quantificadas e sua qualidade medida em um espectrofotômetro (HITACHI,modelo U-2000). Foram realizadas medidas em dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. Com a primeira medida é calculada a concentração do DNA e com a razão obtida entre os dois comprimentos de onda medidos é calculada a proporção da concentração de proteínas na amostra em relação a concentração do DNA que deve ser de no máximo 1,80.

Alguns animais possuíam DNA com baixa qualidade e estas amostras foram então separadas para que sua amplificação fosse realizada separadamente, pois nesses casos era preciso aumentar sua concentração final para que obtivéssemos resultados satisfatórios.

Todas as amostras foram então padronizadas quanto a sua diluição para que estivessem numa concentração de estocagem de 100 ng/µl e uma concentração de uso de 20 ng/µl.

Após a diluição das amostras e definição das famílias de cada animal, foram montadas 5 placas de 96 poços que consistiam em famílias completas com representantes parentais, F1 e F2, facilitando desta maneira a identificação dos animais nas etapas seguintes. Para as placas foram usadas alíquotas de 20 ng/µl de DNA para adequar as amostras às reações de PCR.

Essas placas foram então identificadas, seladas com adesivo plástico e armazenadas em freezer a uma temperatura de – 20ºC.

3.3 Coleta dos dados fenotípicos

A avaliação das características fenotípicas da população foi realizada no Campo Experimental Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, localizado em Valença, RJ.

Quanto à resistência a ectoparasitas, foi avaliada a resistência ao carrapato *Boophilus microplus.* Utilizou-se a avaliação absoluta para determinação do nível de resistência dos animais F_2, que foi realizada através da contagem das fêmeas de carrapatos que completaram seu ciclo após a infestação artificial com número conhecido de larvas. Dada a importância da precisão na avaliação dessa resistência, foram feitas

infestações artificiais por animal com 10.000 larvas cada, e as contagens sendo realizadas no dia modal de queda dos carrapatos, que, de acordo com a literatura, ocorre no 21º dia após a infestação (Seifert, 1984).

As larvas foram preparadas em laboratório na Embrapa Gado de Leite, incubando-se meio grama de ovos por frasco (equivalente a 5.000 larvas). Dois frascos contendo as larvas infectantes foram inseridos em colar adaptado colocado na região cervical do animal, de modo que as larvas pudessem atingir ambos os lados do corpo.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, na idade de 10 a 14 meses, em torno de 20 a 30 animais por grupo e mantidos a pasto, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. As infestações foram feitas durante duas épocas do ano, águas e seca, possibilitando que alguns grupos fossem mensurados mais de uma vez.

Foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro, de um lado do animal, multiplicando-se o resultado por dois para obtenção do número total de carrapatos por animal. As contagens foram feitas pela manhã, até aproximadamente 9 horas, quando a maioria dos carrapatos se desprendia dos animais.

Para realização dos ajustes foi utilizado o procedimento de linearização das variáveis utilizando o logarítimo da contagem de carrapatos. A transformação de rank também foi testada para ajuste da característica de contagem de carrapatos e utilizada para o mapeamento de QTL.

Os animais foram pesados ao nascimento e aos 60 dias de vida, logo após a desmama. Estes dados fenotípicos também foram utilizados nas análises de mapeamento de QTL.

3.4 Escolha dos marcadores microssatélites

Os marcadores foram escolhidos tendo como base os mapas disponíveis, principalmente o mapa genético produzido pelo Painel de Referência Internacional de Bovinos (Barendse *et al.*, 1997). A escolha dos marcadores foi baseada na sua posição no mapa (distância entre marcadores em torno 20 cM), multialelismo e mínimo de 50% de heterozigosidade, tendo como referência o que foi previamente publicado na literatura.

Para a definição dos marcadores, foram utilizadas informações obtidas no website do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (www.marc.usda.gov, setembro de 2002).

Numa primeira etapa foram avaliados os genótipos dos progenitores e dos indivíduos F1, com vários marcadores, visando selecionar quais eram heterozigotos nos F_1 e qual a origem paterna de cada alelo nos heterozigotos. Foram selecionados, ao todo, 5 marcadores microssatélites para o cromossomo estudado. Estes marcadores selecionados foram utilizados para a genotipagem dos animais da população F2 disponíveis.

Foram avaliadas algumas informações a respeito dos marcadores como, por exemplo, o número de alelos, a heterozigosidade e seu conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) utilizando-se o programa CERVUS versão 2.0 (Marshall et al, 1998) (http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html).

3.5 Preparo das reações de PCR

Cada marcador teve sua reação otimizada para que sua amplificação fosse satisfatória para posterior análise dos genótipos.

A otimização de cada marcador ocorreu com a variação da temperatura de anelamento, com o auxílio do termociclador (Peltier Thermal Cycler – DNA Engine DYAD®) com gradiente de temperatura, e do tampão de PCR onde eram ajustados o pH e a concentração de magnésio ótimos para cada marcador. Após varias tentativas optou-se por fixar o tampão e apenas variar a temperatura de anelamento dos marcadores. Desta maneira, o tampão da reação de PCR era produzido para que sua concentração final fosse de 300 mM de Tris-HCl, 75 mM de sulfato de amônio e 2,0 mM de cloreto de magnésio e pH 8,5.

A verificação da eficiência da reação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 2%. Essa avaliação consistiu em analisar a intensidade e o tamanho da banda produzida. Essas informações foram utilizadas para análise em seqüenciador automático

3.6 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram analisados através de leitura no seqüenciador MegaBACE-1000 (Amersham Biosciences). Para isso eram utilizados até 3 placas diferentes de produtos amplificados por placa do MegaBACE, ou seja, eram misturados 3 produtos diferentes numa mesma placa. Desta maneira, colocava-se de 2 a 8 µl do produto amplificado de cada placa de acordo com a intensidade da banda no gel de agarose e prosseguia-se a diluição 8x das amostras totais dos produtos amplificados misturados. Após a diluição, 2 µl da mesma eram acrescidos a 8 µl de uma solução de 25% de Ladder (ET-ROX 400 Size Standard) e 75% de Tween 20 diluído 1x, por poço. As placas prontas eram então lacradas por meio de um adesivo plástico, embrulhadas em papel alumínio e armazenas em freezer à -20˚C até o momento da aplicação no seqüenciador. Antes da aplicação, era realizada uma desnaturação por 1 minuto a 95˚C.

Essas placas eram então aplicadas no seqüenciador automático MegaBACE, um seqüenciador que trabalha por eletroforese capilar numa matriz chamada "LPA" que consiste num polímero que é injetado sob pressão de nitrogênio. Após isso, segue-se a injeção das amostras que é feita pela migração das moléculas de produto de PCR contidas na placa através da matriz. Essas moléculas passam então por um laser, onde são identificadas em relação à sua marcação e tamanho do fragmento. Essa identificação é possível devido ao uso do padrão de peso molecular utilizado ("MegaBACE ET 400-R Size Standard") que possui os tamanhos em pares de base a seguir: 60, 90, 100, 120, 150, 160, 170, 190, 200, 220, 250, 270, 290, 300, 310, 330, 350, 360, 380, 400. Já a identificação da coloração dada pela marcação de cada iniciador com fluorescência é feita através de um jogo de filtros do seqüenciador que reconhecem determinadas cores "FAM" (azul) e "HEX" (amarelo).

O tempo máximo de duração da eletroforese capilar no MegaBACE foi de 100 minutos, utilizando condições de injeção das amostras na pré-corrida de 3 kV por 80 segundos e a eletroforese realizada a 9 kV.

A análise dos genótipos foi realizada através do programa Genetic Profiler que acompanha o seqüenciador. Este programa calcula o tamanho dos fragmentos de acordo

com o padrão usado e as informações de cada marcador que são inseridas no programa no ato de preparo da corrida. Com estas informações o programa calcula os picos de cada marcador fornecendo, desta maneira, o genótipo de cada animal, que é dado pelo tamanho do fragmento encontrado.

3.7 Montagem do mapa de ligação

Os genótipos de todas as progênies (294 indivíduos F2) das quatro famílias de touros foram analisados utilizando-se o programa CRIMAP (Green et al, 1990) para produzir o mapa de ligação dos marcadores. Este programa utiliza genótipos de uma população para os marcadores utilizados, ordenando e determinando as distâncias entre os marcadores utilizando as taxas de recombinação, através da função de mapeamento de Kosambi, se estes marcadores estiverem em um mesmo grupo de ligação. Desta forma, este mapa foi construído utilizando a análise com marcadores múltiplos por meio da máxima verossimilhança (MML) com um intervalo suporte de *LOD score* maior do que 2,5.

Desta maneira, após a obtenção da ordem dos marcadores para as famílias estudadas (função BUILD do programa), eram obtidas as recombinações possíveis para cada indivíduo dentro de cada família (função CHROMPIC), assim cada indivíduo pode ser avaliado quanto as recombinações ocorridas e se as mesma vieram de origem materna ou de origem paterna.

Para a confirmação da qualidade do mapa, foram realizados os procedimentos de "flip" que consiste em trocar as posições dos marcadores 2 a 2 e verificar se há alteração na sua qualidade. Isso é feito através da comparação dos resultados de verossimilhança fornecidos pelo programa. Quanto maior este valor, melhor a qualidade do mapa obtido.

3.8 Mapeamento de QTL – QTL Express

Esta etapa trabalha com 3 arquivos distintos para a detecção de possíveis QTL: um arquivo de genótipos, um arquivo de fenótipos e outro com as informações acerca

do mapa do cromossomo em estudo. Esses arquivos foram então submetidos ao programa QTL Express (Seaton et al., 2002) (http://qtl.cap.ed.ac.uk) para a obtenção dos resultados quanto a identificação dos QTL associados ao cromossomo 23.

O QTL Express analisa diversos delineamentos experimentais, mas para este trabalho foi utilizada a opção de análise de F2, com a procura de um QTL por cromossomo que segue um procedimento de duas fases para o mapeamento de QTL. Primeiramente pela determinação das probabilidades da Identidade-Por-Descendencia (IBD) na localização cromossomal específica de dados de marcadores múltiplos e posteriormente adequando o modelo estatístico das observações e os coeficientes de IBD (Seaton et al, 2002).

Modelos lineares são adequados aos dados fenotípicos pelo uso de um modelo linear geral, isto é, permitindo que efeitos fixos adicionais e covariáveis expliquem a variação da característica. Nas populações F2, o QTL é mapeado pela explicação da variação genética entre as linhagens fundadoras, isso implica na pressuposição de que s linhagens parentais possuem alelos alternativos fixados para o QTL em estudo.

O programa realiza testes de permutação para definir valores de significância (de 1 e 5%) e procedimentos de permutação com reamostragem (*bootstrap*) para a definição do intervalo de confiança para a localização de cada QTL.

4 RESULTADOS

4.1 Coleta dos dados fenotípicos

A coleta dos dados fenotípicos foi realizada para a característica infestação de carrapatos medindo-se os animais em duas estações: seca e águas (Tabela 1). Houve certa diferença entre as medidas, porém não foi possível calcular sua significância, pois até a finalização deste estudo apenas 167 animais haviam sido observados para esta característica, sendo que somente 102 animais haviam sido observados nas duas estações. Assim, com um número pequeno de dados, não foi possível realizar um estudo detalhado desta característica, pois havia menos da metade das observações previstas para este estudo. Para uma melhor análise dos dados, optou-se pela correção para época do ano e posterior linearização dos dados por logarítimo da contagem.

Como dados adicionais foram mensurados os pesos ao nascimento e aos 60 dias (Tabela 1). Para essas características todos os animais genotipados possuem seus fenótipos mensurados. Essa análise pôde ser feita completamente devido à disponibilidade de todos os dados necessários. Para a característica peso aos 60 dias, apenas 4 animais não tiveram seu peso coletado, pois morreram antes de completarem 60 dias.

Tabela 1. Média e desvio padrão da contagem de carrapatos, logaritmo da contagem de carrapatos, peso ao nascimento e peso aos 60 dias

Característica	**N**	**Média**	**Desvio padrão**
Contagem de carrapatos	167	35,889	43,554
Log da contagem de carrapatos	167	3,012	1,176
Peso ao nascimento (em Kg)	294	29,811	6,133
Peso aos 60 dias (em Kg)	290	55,273	8,607

4.2 Escolha dos marcadores microssatélites

Os marcadores foram escolhidos tendo como base as informações contidas no site do USDA (www.marc.usda.gov, novembro de 2004), desta forma foram selecionados os seguintes marcadores: BM 1258, BM 1818, BM 1905, BB 705 e CSSM 24. Através do programa Cervus 2.0 (Marshall et al, 1998) foram calculadas informações a respeito de cada marcador utilizado tendo como base os genótipos dos animais parentais e F_1 (Tabela 2).

Tabela 2. Informações sobre os marcadores escolhidos

Nome do marcador	Heterozigozidade	PIC	Nº de alelos
BM 1258	77,5 %	0,778	6
BM 1818	67,9 %	0,712	7
BM 1905	86,9 %	0,823	9
BB 705	41,6 %	0,403	4
CSSM 024	61,4 %	0,634	12

Cada um dos marcadores obedecia às pressuposições impostas quanto a sua posição, heterozigozidade e número de alelos. Somente o marcador BB705, não obedeceu a essas pressuposições, porém foi escolhido devido sua proximidade ao BoLA-DRB1, que é um dos genes responsável pela formação do complexo maior de histocompatibilidade, que atua diretamente sobre a resposta imunológica do animal. Como o estudo previa a localização de QTL ligados a características de resistência, esse marcador tornou-se interessante, uma vez que, segundo o mapa publicado pelo INRA, este marcador se encontra a 2 cM do BoLA e, portanto, deve segregar juntamente com o mesmo.

4.3 Preparo das reações de PCR

Para a otimização da reação foram sugeridas várias técnicas: variação de pH, variação da concentração de cloreto de magnésio, variação da concentração de Taq polimerase e variação de temperatura de anelamento. Após várias tentativas optou-se por fixar o tampão (ver Materiais e Métodos) e submeter os marcadores a um gradiente de temperatura de anelamento, variando de 50 a 62°C. Após o término da reação, as amostras eram avaliadas em um gel de eletroforese para determinação da temperatura de anelamento ótima para cada marcador (ver Figura 1).

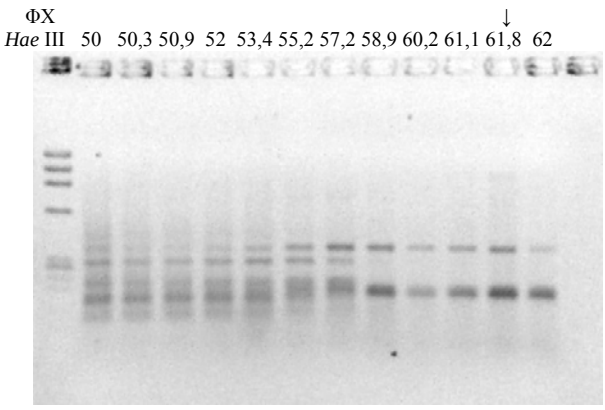

Figura 1- Foto de gel de agarose mostrando teste de gradiente de temperatura (em °C) para o marcador BM 1905 (a seta indica a temperatura ótima). ΦX *Hae* III (marcador de peso molecular)

Desta forma, foram definidas as temperaturas de anelamento para cada marcador (Tabela 3).

Tabela 3. Temperatura de anelamento para cada marcador.

Marcador	Temperatura de anelamento (°C)
BM 1258	61,8
BM 1818	53,4
BM 1905	61,8
BB 705	61,1
CSSM 024	57,2

4.4 Análise dos produtos amplificados

Após a escolha dos marcadores utilizados e sua amplificação (Figura 2), as amostras foram aplicadas no seqüenciador automático MegaBACE-1000. Para isso, algumas informações a respeito dos marcadores, como tamanho máximo e mínimo dos alelos, foram introduzidas na programação do seqüenciador para que este fornecesse, ao final do processo, o genótipo de cada indivíduo para cada marcador corretamente.

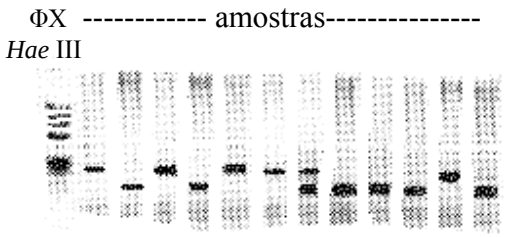

Figura 2- Gel de agarose mostrando a amplificação do marcador CSSM24

Após o término da corrida, era apresentado um eletroferograma para cada indivíduo, onde podiam ser visualizados os picos, que representam o genótipo, o tamanho de cada alelo e sua coloração.

Cada um dos marcadores possuía um determinado padrão de amplificação assim, além de observamos sua presença, era necessário observamos também se seu padrão era mantido para que não houvesse confusão com uma possível banda inespecífica.

Ao final de todas as corridas, foram obtidos os seguintes resultados de genotipagem para cada marcador e cada grupo de indivíduos (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados gerais da genotipagem

Marcador	**BM 1258**	**BM 1818**	**BM 1905**	**BB 705**	**CSSM 024**
Nº. de Parentais Genotipados	24	24	26	24	25
Nº. de F1 Genotipados	61	55	62	60	61
Nº. de F2 Genotipados	266	199	272	272	270
Número de alelos encontrados	6	7	9	4	12

Após a análise dos eletroferogramas pelo programa Genetic Profiler, era criada uma tabela no Excel® com os animais, o tamanho de seus alelos e a qualidade da genotipagem.

4.5 Montagem do mapa de ligação

Após a entrada inicial dos dados, o programa nos dá uma relação com os genótipos que não conferem com a família, desta forma foi detectado um erro de paternidade de 2 animais que foram excluídos das análises posteriores. Outra informação que o programa fornece é o número de meioses informativas para cada marcador, tanto para a fase conhecida (que é a fase onde o programa consegue identificar a origem dos marcadores) quanto pra a fase desconhecida (onde o programa infere sobre a origem dos marcadores inseridos) (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidade de meioses fornecidas por cada marcador

Marcador	Número de meioses informativas (fase desconhecida)	Número de meioses informativas (fase conhecida)
BM 1258	494	416
BM 1818	542	496
BM 1905	333	287
BB705	418	253
CSSM 024	550	426

Assim que os problemas de incoerência de genótipos foram solucionados, a opção BUILD do programa foi selecionada para que pudesse então ser construído o mapa de ligação dos marcadores. Esta opção fornece, além da posição de cada marcador em relação aos outros marcadores, a posição no mapa (assumindo-se que o primeiro marcador posicionado é o de posição zero cM) e a fração de recombinação de cada um deles. Desta forma, o mapa obtido, suas posições relativas e as frações de recombinação são mostradas a seguir (Tabela 6).

Tabela 6. Mapa de ligação e taxa de recombinação dos marcadores

Marcador[1]	Fração de Recombinação	Posição Relativa (cM)	Posição no Mapa (cM)
BM 1258			0.0
	0.19	19.7	
BB 705			19.7
	0.26	28.8	
CSSM 024			48.5
	0.17	17.8	
BM 1905			66.3
	0.25	27.7	
BM 1818			94.1

1- Os marcadores estão dispostos na ordem colocada pelo programa.

As distâncias encontradas estão de acordo com o esperado, pois estão numa distância de aproximadamente 20 cM entre cada um dos marcadores. Como houve discrepância entre as ordens obtidas para os marcadores e aquela apresentada pelo consenso, foram realizados testes, como o *flip* e o *twopoint*, para a confirmação da qualidade do mapa. Em todos os testes, o mapa construído obteve uma qualidade considerada ótima, ou seja, após o programa realizar todas as combinações possíveis para a montagem do mapa, o que apresentou melhor valor de verossimilhança foi aquele que apresentava a inversão.

Outra opção do programa CRIMAP utilizada foi o CHROMPIC que fornece as recombinações sofridas por cada animal e fornece também se determinado alelo é de herança materna ou paterna.

4.6 Mapeamento de QTL

A primeira característica analisada foi o logaritmo da contagem de carrapatos. Primeiramente foi realizada o mapeamento do QTL. Após esta análise, foi realizada uma permutação com reamostragem para definição do intervalo de confiança. Nessa análise foi constatada que não havia a presença de QTL para esta característica no cromossomo 23. Observando os resultados das demais análises temos a confirmação da ausência de QTL, pois o resultado mostrou um valor da estatística do teste F de 3,47 quando seu resultado só seria significativo no cromossomo, a 1%, se o mesmo apresentasse valor igual ou superior a 6,69 (Figura 3).

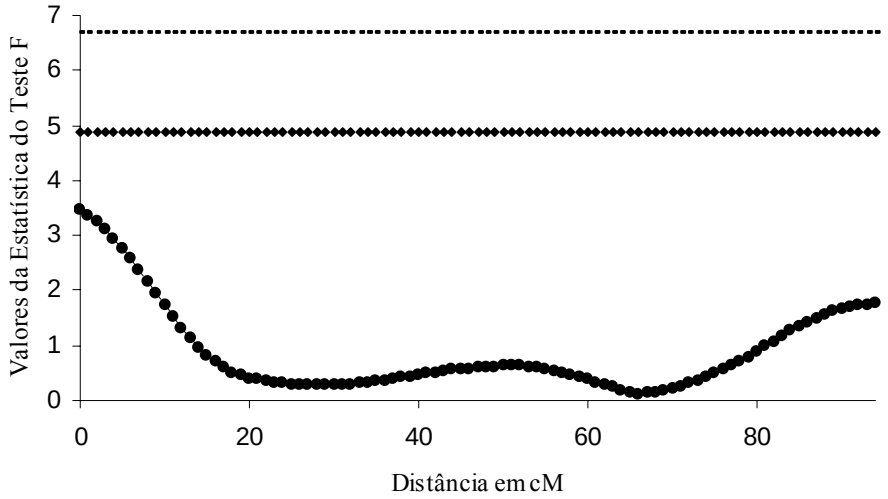

Figura 3- Resultado do teste estatístico para o logaritmo da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa Embrapa. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

Também foram utilizadas as informações do mapa fornecido pelo MARC, porém os resultados foram semelhantes aos obtidos com o mapa Embrapa. O resultado do mapeamento de QTL obtido com esse mapa está representado abaixo, sendo que o valor de significância, a 1% foi de 6,755. (Figura 4)

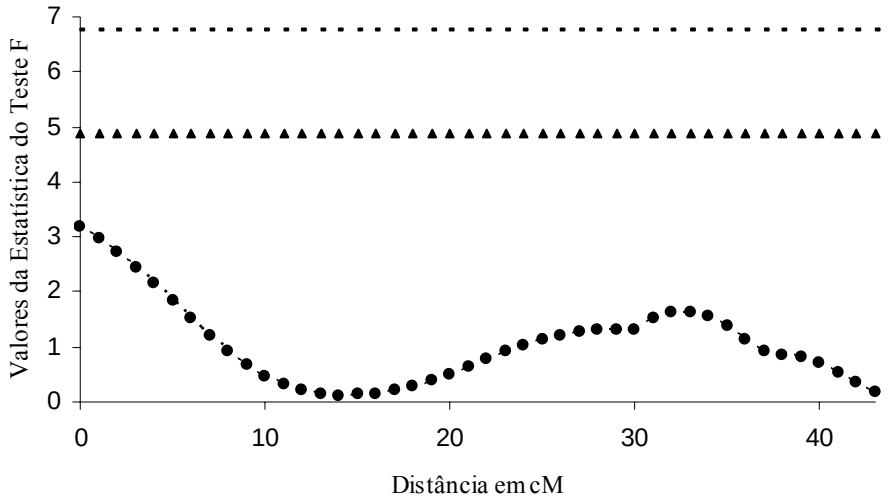

Figura 4- Resultado do teste estatístico para o logaritmo da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa MARC. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

Posteriormente a essa análise foi usado, para o mapeamento de QTL, os dados fenotípicos de contagem de carrapatos ajustados pela transformação rank. Para essa transformação, os resultados foram diferentes, tanto para o mapa Embrapa quanto para o mapa MARC, sugerindo a presença de QTL para essa característica no cromossomo 23 (Figura 5 e 6).

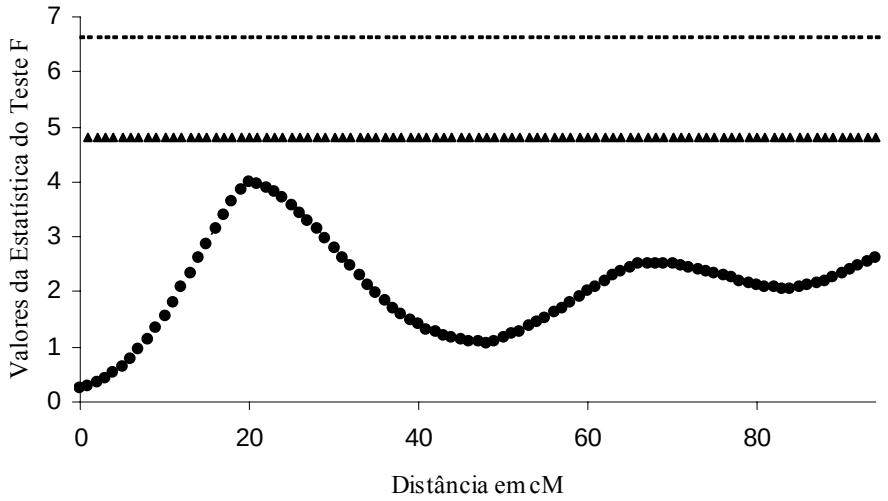

Figura 5- Resultado do teste estatístico para transformação rank da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa Embrapa. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

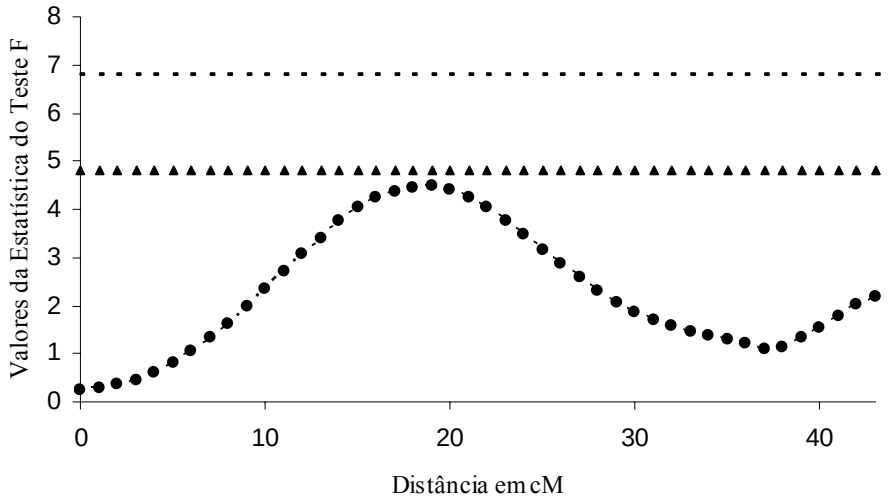

Figura 6- Resultado do teste estatístico para transformação rank da contagem de carrapatos utilizando-se o mapa MARC. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

Para tentativa de detecção de QTL quanto a característica de peso ao nascimento, o mesmo procedimento foi utilizado. Não houve QTL associado a esta característica com nenhum dos mapas estudados. Os valores de significância do teste, ou seja, o valor a partir do qual teríamos a presença de um QTL, obtidos para cada um dos mapas foram de $p_{0,01}$=6,77 para o mapa Embrapa e $p_{0,01}$= 6,53 para o mapa fornecido pelo MARC. Os gráficos das análises da característica de peso ao nascimento em cada um dos mapas estão representados a seguir. (Figura 7 e 8)

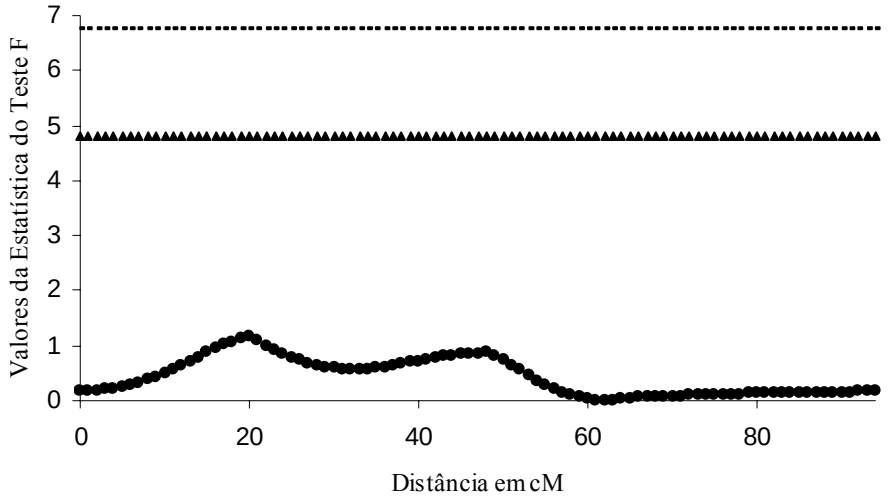

Figura 7- Resultado do teste estatístico para peso ao nascimento utilizando-se o mapa Embrapa. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

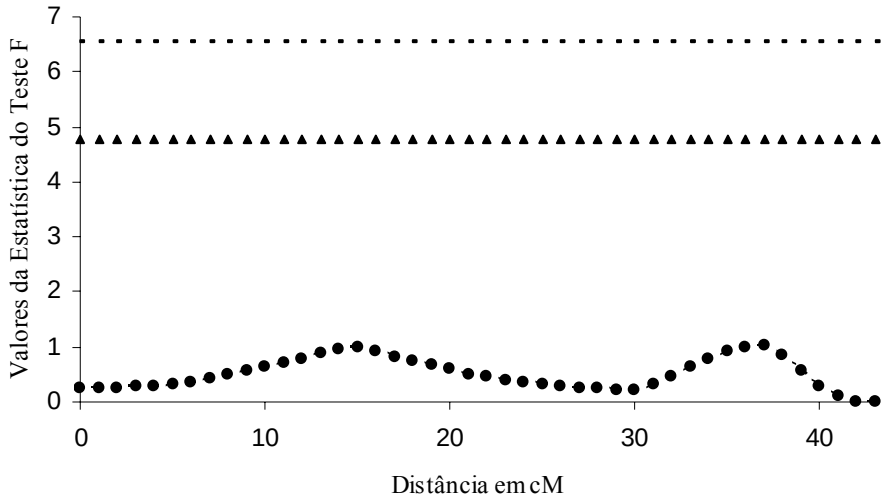

Figura 8- Resultado do teste estatístico para peso ao nascimento utilizando-se o mapa MARC. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

Na tentativa de associação de QTL com a característica de peso à desmama, nenhum QTL foi associado e, novamente, não houve grandes discrepâncias entre os valores obtidos nos diferentes mapas estudados. Os valores de significância para cada mapa foram os seguintes: $p_{0,01}$=6,65 para o mapa Embrapa e $p_{0,01}$=6,63 para o mapa MARC. Os gráficos que representam os resultados da análise de *Bootstrap* para cada mapa são apresentados a seguir. (Figuras 9 e 10)

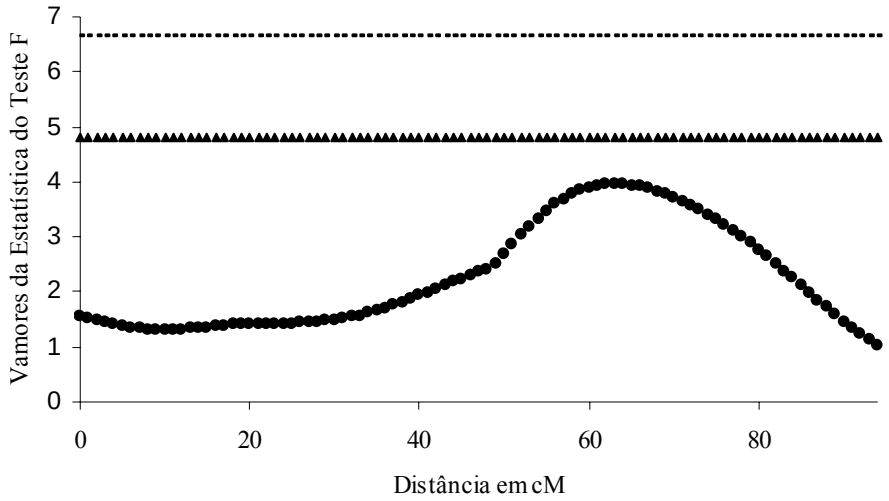

Figura 9- Resultado do teste estatístico para peso a desmama utilizando-se o mapa Embrapa. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

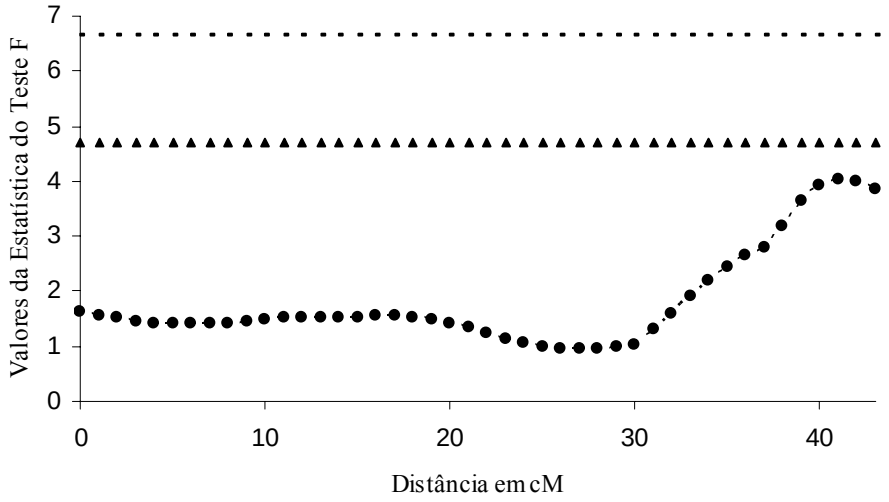

Figura 10- Resultado do teste estatístico para peso a desmama utilizando-se o mapa MARC. A linha tracejada superior indica o valor do teste F para significância a 1% e a linha pontilhada abaixo para a significância a 5%

5 DISCUSSÃO

O número de indivíduos da população experimental utilizada para este trabalho foi bastante inferior ao previsto, pois ocorreram diversos problemas durante a formação desta população. Fatos como morte precoce dos animais F_2, erros de paternidade e descarte de animais, impediram a finalização das análises com o número de animais proposto inicialmente. Porém isso não impossibilitou as análises, apenas reduziu seu espaço amostral que esteve dentro do proposto por Beckman e Soller (1988) para detecção de QTL. Assim o presente estudo pôde ser finalizado sem maiores prejuízos.

Não foi obtida a totalidade dos dados de todos os animais F_2 para a característica de resistência a carrapatos, pois os animais nascidos são separados em grupos e medidos apenas duas vezes (estação das águas e da seca) para obtenção de resultados relevantes quanto à resistência de cada animal. Desta forma, alguns dos animais genotipados possuíam apenas uma das medidas, pois a finalização dessas medidas se dará até o final do ano corrente.

Durante a otimização dos marcadores foram observados vários problemas, pois nem todos os marcadores apresentaram uma amplificação satisfatória, fazendo com que nem sempre se obtivesse uma amplificação adequada para genotipagem. Este problema foi contornado pelo aumento da concentração de DNA na reação de PCR. Quando nem isso produzia o efeito desejado, optou-se então pelo aumento da concentração de *Taq* polimerase na reação de PCR. Após otimização de todos os marcadores, observou-se que as temperaturas propostas pela literatura diferiram muito das obtidas, uma vez que nem todos os trabalhos forneciam todas condições utilizadas nas reações e, desta forma, não havia como reproduzir seus resultados. Desta forma foi mais prático e eficiente a

otimização dos marcadores com condições padrão e alteração de apenas um fator, a temperatura de anelamento.

Após a genotipagem das amostras, nem todos os animais tiveram todo seu genótipo definido, porque alguns animais não apresentavam uma boa amplificação devido à baixa qualidade de seu DNA. Outro fator foi a característica do marcador: alguns marcadores se apresentavam de difícil amplificação, como por exemplo, o marcador BM 1818, pois quando da reação de PCR, o mesmo formava dímeros de primer o que reduzia muito a quantidade de produto amplificado e, da mesma forma, reduzia sua eficiência e qualidade. A associação desses fatores acabava por produzir eletroferogramas de aparência duvidosa, fazendo com que muitas vezes não fosse possível determinar com clareza o genótipo do animal. Para contornar esse problema optou-se por, no momento da análise dos genótipos, dispor os eletroferogramas de forma a deixar o animal em análise na mesma tela de seus pais, assim era mais fácil identificar seus alelos e qualquer dúvida oriunda de uma amplificação de má qualidade pudesse ser resolvida pela comparação dos genótipos da família analisada. Desta forma, também foi mais fácil identificarmos o caminho de determinado alelo dentro de cada família estudada.

Após a construção do mapa de ligação dos marcadores através do programa CRIMAP, foi realizada a comparação do mapa Embrapa com o publicado pelo MARC (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os mapas MARC e o mapa Embrapa

Mapa MARC		Mapa Obtido	
Marcador	Posição	Marcador	Posição
BM 1258	28.307 cM	BM 1258	28.31 cM
BB 705	43.103 cM	BB 705	48.01 cM
BM 1818	58.195 cM	CSSM24	76.81 cM
CSSM24	65.715 cM	BM 1905	94.61 cM
BM 1905	71.648 cM	BM 1818	122.31 cM

Foram observadas algumas diferenças entre o mapa Embrapa e o mapa fornecidos pelo MARC, que consistiram em uma discrepância entre as ordens dos marcadores sendo verificado que o marcador BM 1818 apresentou-se na posição final do cromossomo, diferentemente da posição encontrada pelo MARC.

Também foi observado que o mapa Embrapa apresentou um tamanho superior ao obtido pelo mapa consenso. Segundo Zhang *et al* (1998), esta diferença pode estar relacionada com a função utilizada para a montagem do mapa. A diferença as funções está no fato de que a função de mapeamento de Haldane assume a ausência de interferência e a função de mapeamento de Kosambi assume que a interferência diminui como uma função linear da distância (Silva, 2002). O programa CRIMAP utiliza a função de Kosambi para o cálculo do mapa e alguns mapas utilizam a função de Haldane para este fim. Porém as funções não alteram as posições relativas obtidas entre os marcadores.

A discussão sobre qual mapa seria utilizado para as análises de identificação de QTL foi iniciada devido ao fato das diferenças existentes entre o mapa Embrapa e o mapa MARC. Segundo Plante *et al* (2001), dever-se-ia utilizar o mapa fornecido pelo MARC, pois este apresenta um adensamento maior de marcadores e os possíveis erros de genotipagem seriam bem menores, uma vez que foram genotipadas todas as gerações; desta forma também todos os QTL que fossem identificados seriam internacionalizados devido à utilização de um mapa já conhecido e por que já foi demonstrado por Nadesalingham (1999) que não há diferenças consistentes na utilização de outros mapas. Como o mapa obtido neste estudo apresentava uma inversão não encontrada nos outros mapas, a melhor solução encontrada foi a realização das análises para os dois mapas disponíveis, uma vez que os mapas apresentavam diferenças e o mapa Embrapa não pôde ser descartado uma vez que apresentava uma boa qualidade e uma população obtida através do delineamento experimental de F_2, onde todos os animais de todas as gerações foram genotipados consistindo numa grande quantidade de informação.

Plante et al (2001) observaram que numa comparação entre o tamanho do cromossomo apresentado pelo consenso e o realizado com a população experimental

estudada, houve um aumento de 36,2% no comprimento do cromossomo 23. O mesmo fenômeno pôde ser observado neste estudo.

Após todas as análises não foi encontrada nenhuma diferença relevante entre as análises do mapa Embrapa e o mapa MARC. Desta forma foi possível concluir que realmente, como demonstrou Nadesalingham (1999), não há diferenças consistentes que justifiquem a utilização deste ou daquele mapa.

Como discutido anteriormente, não houve um número satisfatório de observações para a característica de resistência a carrapatos, o que pode ter interferido no resultado, uma vez que o número de animais genotipados era bem superior.

Porém quando foi utilizada a transformação de rank para a contagem de carrapatos, os resultados sugeriram a presença de um QTL próximo a 20 cM do cromossomo 23, e esse resultado apareceu tanto para o mapa Embrapa quanto para o mapa MARC. Segundo Montgomery (1991), a transformação rank tem grande aplicação em problemas para os quais não existe análise não-paramétrica alternativa a análise da variância. O resultado da aplicação do teste F a dados ordenados resulta em valor com boas propriedades estatísticas. Quando estamos preocupados com a normalidade dos dados ou com a presença clara de observações extremas, é recomendado que a análise seja feita tanto na escala original como na escala dos ranks. Quando ambas produzem resultados similares, então é sugerida a utilização da escala original. No entanto, quando as duas apresentam resultados distintos, então a escala dos ranks deve ser preferida, uma vez que ela é menos afetada pela não-normalidade e pelas observações não-usuais.

Desta forma, ambos os resultados foram apresentados e, assim como sugere Montgomery (1991), houve diferenças nos resultados produzidos por ambas transformações. Porém não há como discutir apropriadamente este resultado, uma vez que não há na literatura nenhuma informação acerca da detecção de QTL para a característica de resistência a carrapatos. No entanto, deve-se insistir na busca por QTL de características de resistência a doenças neste cromossomo uma vez que todo o complexo maior de histocompatibilidade do bovino se encontra nele.

Já para as características de peso ao nascimento e a desmama, Elo et al (1999) encontraram um QTL significativo entre os marcadores BM 1258 e BB 705 para a

característica de peso vivo numa população de bovinos de leite da raça Finnish Ayrshire, porém com delineamento experimental de netas. Isto pode indicar que na verdade exista um QTL associado a essas características no cromossomo 23, porém não houve número suficiente de informações para que este fosse identificado.

Alguns estudos já mapearam QTL para outras características no cromossomo 23. Kim et al (2003) encontraram um QTL para peso de carcaça quente em bovinos mestiços Angus e Brahman utilizando delineamento experimental de F2. Plante et al (2001) estudando uma população de bovinos da raça Holandesa, encontraram sugestão de QTL relacionado com efeitos gerais na porcentagem de leite, gordura e proteína, porém não foi possível a identificação exata da posição deste QTL uma vez que o mesmo segregava em apenas algumas famílias.

Ashwell et al (2004) encontraram um QTL para contagem de células somáticas no cromossomo 23 em bovinos da raça Holandesa na posição 50 cM, entre os marcadores BB 705 e BM 1818. Li et al (2004) estudaram uma população de bovinos de corte comercial (*Bos taurus*) e identificaram um QTL para capa de gordura no cromossomo 23 numa posição entre 45.1 a 50.9 cM, que não pode ser bem definida.

Um outro ponto de discussão relaciona-se aos fatores que podem influenciar na detecção de QTL. Como já foi discutido anteriormente, o número de animais influi para que não haja um poder de teste adequado para detecção do QTL. O grau de informação dos marcadores utilizados também pode influir, assim como o número de meioses informativas obtidas para o mapeamento.

Os resultados obtidos neste estudo poderiam ser melhorados com: (a) o aumento do número de indivíduos da geração F2, que segundo cálculos de poder do teste, estariam em torno de 438 animais e (b) o adensamento do mapa, agregando mais marcadores nos intervalos obtidos.

Desta forma, mais pesquisas são necessárias tanto para incrementar os resultados aqui apresentados, quanto para realizar as análises posteriores deste projeto que a EMBRAPA – Gado de Leite vem desenvolvendo na busca por QTL de interesse econômico para obtenção de animais mais produtivos e melhor adaptados às nossas condições climáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; SONSTERGARD, T.S. et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 468-475, 2004.

BARENDSE, W; ARMITAGE, S.M.; KOSSAREK, L.M. et al. A medium density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome,** v.8, p.21-28, 1997.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. **Theoretical and Applied Genetics,** v.76, p.228-236, 1988.

BYFORD, I.; COLDITZ, P.; SIBBICK, R. A tick resistant dairy breed. **Queensland Agriculture Journal**, n.102, p.11-15, 1976.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics,** n.138, p.963-971, 1994.

ELLIS, S.A.; BALLINGALL, K.T. Cattle MHC: evolution in action? **Immunological Reviews,** n.167, p.159-168, 1999.

ELO, K.T.; VILKKI, J.; DE KONING, D. et al. A quantitative trait locus for live weight maps to bovine chromossome 23. **Mammalian Genome,** n.10, p.831-835, 1999.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geografic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-470, 2000.

FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The genetics of cattle.** London: CAB International, 1999. 710p.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L.L. de et al. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on feed intake and milk yield of Holstein x Zebu crossbred cows. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE VETERINÁRIA, 15**.,** Campo Grande, 1996. **Anais**. Campo Grande, 1996. p.350.

GEORGES, M. Recent progress in livestock genomics and potential impact on breeding programs. **Theriogenology**, n.55, p.15-21, 2001

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, Springfield, 2003. Springfield: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003. p.68.

GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **CRI-MAP Documentation version 2.4** St. Louis: Washington University School of Medicine, 1990. 1v.

HALLERMAN, E.M.; NAVE, A.; SOLLER, M. et al. Screening of Israeli Holstein-Friesian cattle for restriction fragment length polymorphisms using homologous and heterologous deoxyribonucleic acid probes. **Journal of Dairy Science,** v.71, p.3378-3389, 1988.

HAMMOND, K. Small holder milk recording for developing countries. In: INTERNATIONAL COMMITTEE FOR ANIMAL RECORDING, 29., Ottawa,1994. Ottawa: ICAR , 1994. p.32.

HOOGSTRAAL, H. Acarina (ticks). In: GIBBS, A.J. **Viruses and invertebrates**. Holland: North-Holland Publishing, 1973. cap. 5. p. 89-103.

HEWETSON, R.W. Resistance of cattle to cattle tick Boophilus microplus. II. The inheritance of resistance to experimental infestation. **Australian Journal of Agriculture Research,** v.19, p.495-505, 1968.

IPEADATA. **Contas nacionais**, www.ipeadata.gov.br (05 out. 2004).

KHATAR, M.S.; THOMSON, P.C.; TAMMEN, I. et al. Quantitative trait loci in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetic Selection Evolution,** v.36, p.163-190, 2004.

KIM, J.J.; FARNIR, F.; SAVELL, J. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. **Journal of Animal Science.** v.81, p.1933-1942, 2003.

LEMOS, A.M.; TEODORO, R.L.; OLIVEIRA, G.P. et al. Comparative performance of six Holstein-friesian x Guzerá grades in Brazil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal Production**, v.41, n. 2, p. 187-191, 1985.

LEMOS, A.M. **A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato.** Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, 1986. 42p. (Documento,6).

LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W.M. et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on chromosomes 2, 5, 6, 19, 21 and 23 in a commercial line of *Bos Taurus*. **Journal of Animal Science**, 82, p. 967-972, 2004.

MADALENA, F.E.; TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M. et al. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (B.microplus). **Revista Brasileira de Genética.** v.8, p.361-375, 1985.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.B.E. **CERVUS version 2.0** http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html. (09 set. 2002).

MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A. et al. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. (compact disc) In: SIMPÓSIO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., Pirassununga, 2004. **Anais**. Pirassununga: SBMA, 2004a.

MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A. et al. Associação do gene candidato BoLA-DRB3.2 com resistência a ectoparasitas em bovinos. (compact disc). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., Campo Grande, 2004. **Anais**. Campo Grande: SBZ, 2004b.

MASCIOLI, A.S. Estimativas de parâmetros genéticos e proposição de critérios de seleção para pesos em bovinos da raça Canchim. Jaboticabal, 1995. 95p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments.** 3.ed. New York: John Willey, 1991. 649p.

OLSEN, O.W. **Animal parasites:** their life cicles and ecology. 3.ed. Maryland: University Park Press, 1974. 562p.

PEGRAM, R.G.; JAMES, A.D.; OOSTERWIJK, G.P.M. et al. Studies on the economics of ticks in Zambia. **Experiments Applied in Acarology**, v.12, p. 9-26, 1991.

PLANTE, Y.; GIBSON, J.P.; NADESALINGAM, J. et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on 10 chromossome in Holstein Cattle. **Journal of Dairy Science,** v.84, p.1516-1524, 2001.

RADOSTIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. **Veterinary medicine:** A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9.ed. Londres: Saunders, 2000. 1877p.

REGITANO, L.C.A. Importância da genética molecular para o melhoramento de ruminantes. (compact disc). In: SIMPÓSIO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., Pirassununga, 2004. **Anais**. Pirassununga: SBMA, 2004.

RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Australian Veterinary Journal,** v.32, p.204-209, 1956.

ROCHA, J.L.; POMP, D.; VLECK, D.V. QTL analysis in livestock. **Methods in Molecular Biology**, v.195, p.311-346, 2002.

SEATON, G.; HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. et al. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics Applications Note,** v.18, n.2, p.339-340, 2002.

SEIFERT, G.W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (Boophilus microplus). **Australian Journal of Agriculture Research**, v.22, p.159-168, 1971.

SOLLER, M. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. **Journal of Dairy Science.** v.73, p.2628-2646, 1990.

SOLLER, M.; ANDERSSON, L. Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. **Reviews on Science Technology.** v.17,n.1, p,329-345, 1998.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; OLIVEIRA, G.P. et al. Resistência genética dos bovinos ao carrapato (Boophilus microplus). VI. Herdabilidade e repetibilidade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 21., Belo Horizonte, 1984. **Anais**. Belo Horizonte: SBZ, 1984, p.54.

TEODORO, R.L.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B. et al. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. (compact disc) In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., Pirassununga, 2004. **Anais**. Pirassununga: SBMA, 2004.

THIESEN, W.L. **Biologia do carrapato Boophilus microplus.** In: SEMINARIO NACIONAL SOBRE PARASITOSE DOS BOVINOS, 1., Campo Grande, 1979. Campo Grande: SBZ, 1979. p.207-215.

UTECH, K.B.W.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding australian illawarra shorthorn cattle for resistance to Boophiplus microplus. I. Factors affecting resistance. **Australian Journal of Agriculture Research,** v.29, p.411-422, 1978.

VILLARES, J.B. Climatologia zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genetica dos bovinos ao Boophilus microplus. **Boletim da Indústria Animal,** v.4, p.60-86, 1941.

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. The relation between engorgement and dropping of Boophilus microplus (canestrini) (ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Journal of the Australian Entomology Society,** v.9, p.171-182, 1970.

WELLER, J.I.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **Journal of Dairy Science,** v.73, p.2525-37, 1990.

ZADWORNY, D.; KUHNLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in holstein dairy cattle using the polimerase chain-reaction. **Theoretical and Applied Genetics,** v.80, p.631-634, 1990.

ZHANG, Q.; BOICHARD, D.; HOESCHELE, I. et al. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbreed pedigree. **Genetics**, v.149, p.1959-1973, 1998.