ANA LUISA SOUSA AZEVEDO

VARREDURA GENÔMIICA PARA QTL ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A *Boophilus microplus* EM BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
BRASIL - MINAS GERAIS
2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ANA LUISA SOUSA AZEVEDO

VARREDURA GENÔMIICA PARA QTL ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A *Boophilus microplus* EM BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de setembro de 2006

Paulo Sávio Lopes
(Co-orientador)

Marco Antonio Machado
(Co-orientador)

Mario Luiz Martinez

Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo

Simone Eliza Facioni Guimarães
(Orientadora)

Aos meus pais Dirceu e Terezinha, com muita gratidão,

Aos meus irmãos Juliana e Artur,

A Marco Antonio

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar em mais esta etapa da vida.

A Dirceu e Terezinha, meus pais e grandes amigos, pelo grande apoio, pela dedicação e pelo amor.

Ao Dr. Marco Antonio Machado, pela orientação, pelo incentivo, pela amizade, pela compreensão e pela confiança em meu trabalho.

Ao Dr. Mario Luiz Martinez, pela excelente idealização, liderança e dedicação ao projeto.

À Dr. Simone E. F. Guimarães, pela confiança e disponibilidade oferecida durante todo tempo, que, mesmo distante esteve sempre presente.

À Pesquisadora Ana Lucia Campos, pela disponibilização de todo material genético.

Ao Dr. Jonh Furlong, pela coordenação de toda a avaliação realizada no campo experimental.

As minhas amigas Elisa e Gabriela, pela valiosa ajuda e convivência durante a realização de todo o trabalho.

Aos meus familiares, que sempre incentivaram e acreditaram no meu trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa , pela oportunidade de realização do curso.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em particular ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, que forneceu toda estrutura física para o desenvolvimento do experimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com esta importante etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

ANA LUISA SOUSA AZEVEDO**,** filha de Dirceu Vilela de Azevedo e Maria Tereza Sousa Azevedo, nasceu em 11 de maio de 1982 em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Cursou o primeiro e o segundo grau no Instituto Gammon em Lavras, MG.

Em agosto de 2000, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, MG, diplomando-se em fevereiro de 2004.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese no dia 29 de setembro de 2006.

SUMÁRIO

Página

RESUMO……..... viii

ABSTRACT……... X

1. INTRODUÇÃO……..... 1

2. REVISÃO DE LITERATURA…….. 4

2.1. Carrapato bovino 4

2.2. Mapeamento de QTL 10

2.3. Seleção assistida por marcadores 15

3. MATERIAL E MÉTODOS …….. 19

3.1. Material genético 19

3.2. Avaliação para a resistência ao carrapato bovino 20

3.3. Genotipagem com marcadores moleculares 20

3.4. Análises estatísticas ……..... 22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ……... 24

4.1. Análise dos marcadores moleculares..... 24

4.2. Frequência alélica, heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica..... 30

4.3. Análise de variância……..... 38

4.4. Detecção de QTL……..... 41

5. CONCLUSÕES 45

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……... 46

RESUMO

AZEVEDO, Ana Luisa Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro 2006. **Varredura genômica para QTL associados à resistência a *Boophilus microplus* em bovinos**. Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-Orientadores: Paulo Sávio Lopes e Marco Antonio Machado.

Nos países tropicais, as perdas causadas pela infestação de carrapatos em bovinos acarretam um grande impacto no sistema de produção animal. A variação genética entre *Bos taurus* e *Bos indicus,* para a resistência a carrapatos, juntamente com as ferramentas da biologia molecular, sugerem o uso de marcadores moleculares, associados às características de resistência, como ferramenta auxiliar nos programas de seleção. O objetivo desse trabalho foi identificar QTL associados à resistência/suscetibilidade ao carrapato (*R. microplus*) em uma população F2 de bovinos derivada do cruzamento entre touros da raça Holandesa (*Bos taurus*) e vacas de raça Gir (*Bos indicus*). Foi utilizada a avaliação absoluta para determinação do nível de resistência de cada animal, que é baseada na contagem das fêmeas de carrapatos que completaram seu ciclo após a infestação artificial com um número conhecido de larvas. Foram coletadas amostras de sangue de toda população parental, F1 e F2 para extração de DNA. Para a varredura do genoma, foram utilizados marcadores microssatélites escolhidos no mapa do MARC - USDA. A escolha de cada marcador foi baseada na sua posição no mapa, multi-alelismo e mínimo de 50% de heterozigosidade. Ao

todo, foram selecionados 21 marcadores microssatélites, visando cobrir os cromossomos 13, 18, 19 e 27, com um espaçamento de 20 cM, em média, entre os marcadores. Os dados obtidos a partir da varredura genômica referente aos quatro cromossomos em estudo demonstraram a presença de um QTL com efeito aditivo e dominante (P<0,01), para resistência a carrapato localizado no final do cromossomo 18. Não está claro qual é a origem da resistência para este QTL, visto que ambas as raças compartilham alelos que estão interferindo na resistência ou suscetibilidade nos animais F2. Um possível QTL, com efeito aditivo (P<0,07) e localizado a 16 cM do centrômero também foi encontrado no cromossomo 27. As próximas etapas, após a identificação dos QTL, envolvem: 1- validação destes resultados em rebanhos comerciais de gado de leite e corte, possibilitando a utilização da seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento e 2- refinamento da posição onde o QTL foi mapeado, permitindo a localização mais precisa dos limites do QTL, diminuindo o intervalo em cM, favorecendo assim a identificação dos genes responsáveis pelo efeito do QTL.

ABSTRACT

AZEVEDO, Ana Luisa Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2006. **Genome scan for QTL related to bovine resistance to *Boophilus microplus***. Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães, Co-Advisers: Paulo Sávio Lopes e Marco Antonio Machado.

In tropical countries losses caused by bovine tick infestation have a tremendous economic impact on production systems. Genetic variation between *Bos taurus* and *Bos indicus* to tick resistance and molecular biology tools might facilitate the use of molecular markers linked to resistance traits as an auxiliary tool in selection programs. The objective of this work was to identify QTL associated with tick resistance/susceptibility in a bovine F2 population derived from the Gyr (*Bos indicus*) x Holstein (*Bos taurus*) cross. Tick resistance on each F2 animal was evaluated by counting the number of tick females after 21 days of an artificial infestation with 10,000 larvae. Blood samples of parents, F1 and F2 animals were collected for DNA extraction. Microsatellite markers were chosen from MARC – USDA map to perform a genome scan in four chromosomes. Markers were chosen based on their position in the map, multi-allelism and minimum of 50% heterozygosity. A total of 21 markers were selected to cover chromosomes 13, 18, 19 and 27, with marker interval of 20 cM. This genome scan showed the presence of a QTL with additive and dominant effect ($P<0.01$) for tick resistance located in the end of the chromosome 18. It is not clear the origin of resistance in this QTL,

since both breeds share alleles that most impact resistance or susceptibility in the F2. A putative QTL with dominant effect ($P<0.07$) located at 16 cM from centromere was also found on chromosome 27. The future steps after QTL mapping involve validation of these results in commercial herds of dairy cattle and beef cattle and fine mapping the position of the QTL favoring the identification of candidate genes involved with tick resistance.

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos países em desenvolvimento é de clima tropical e possuem em torno de 60% da população mundial, com um desempenho agrícola inferior aos países de clima temperado (Hammond, 1994). Embora a necessidade de alimento de origem animal seja maior, devido a maior concentração populacional, as condições adversas de ambiente não permitem um desempenho produtivo satisfatório dos animais. Nessas regiões, as infestações por parasitas têm provocado, além da redução na produtividade, até mesmo a morte dos animais mais suscetíveis. Os bovinos estão constantemente ameaçados por lesões de enfermidades causadas por carrapatos, favorecidas principalmente pelo seu ciclo evolutivo, onde passam um período no animal.

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 168 milhões de cabeças, sendo que 140 milhões são explorados para a atividade de corte e 28 milhões para atividade de leite (CNA, 2006). A pecuária, em 2005, foi responsável por cerca de R$67,84 bilhões do PIB do Brasil (CNA, 2006), o que mostra a grande relevância econômica e social para o país. As perdas provocadas pelos ecto e endoparasitas provocam reduções drásticas na produção de carne e leite. O país deixa de produzir 28 milhões de arrobas de carne/ano (aproximadamente R$1,1 bilhões) e 4,3 bilhões de litros de leite/ano (aproximadamente R$1,3 bilhões). Além disso, a infestação por carrapatos e

bernes contribui significativamente para a perda da qualidade do couro, sendo que apenas 8% do couro produzido é comercializado como de primeira qualidade. Além dessas perdas, estima-se que o gasto anual com os produtos químicos para o combate aos parasitas, seja da ordem de R$ 800 milhões.

Segundo Honer e Gomes (1990), um bovino infestado com carrapatos e parasitado por vermes, se não for tratado, pode sofrer perdas de 18 a 47 kg de peso/ano, sem considerar as possíveis perdas relacionadas às doenças transmitidas pelos carrapatos. Furlong *et al.* (1996) utilizaram fêmeas mestiças Holandês-Zebu e verificaram que a queda da produção de leite por vaca foi de 23%, quando estas estavam com uma média de 105 carrapatos/vaca. Teodoro *et al.* (1998) estimaram uma perda de 26% (529 kg) na produção de leite por lactação quando compararam vacas holandesas puras por cruzamento, banhadas e não banhadas com carrapaticida. O combate a esses parasitas normalmente é feito com produtos químicos que, na grande maioria, deixam resíduos na carne, no leite e nas fezes, trazendo vários riscos para a saúde humana e ou contaminando o meio-ambiente, causando vários prejuízos para a natureza. O melhoramento genético, visando à obtenção de animais mais tolerantes a parasitas, é uma alternativa mais eficiente, mais barata e não provoca danos ao meio ambiente.

A seleção clássica baseia-se no fenótipo do indivíduo e, em muitas situações, o fenótipo não se manifesta no indivíduo para características expressas em apenas um sexo (produção de leite) ou em características de difícil mensuração (eficiência alimentar, resistência a doenças). Em muitas situações, o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo. Isto é devido ao fato de que, a variação genética, depende da variação alélica em um grande número de locos e, a expressão gênica destes locos, é altamente afetada pelos fatores do meio ambiente. Nesta situação, diz-se que a variação da característica ou variação genética é de natureza quantitativa, e os locos individuais que afetam a expressão da característica são denominados QTL (locos de característica quantitativa) (Geldermann, 1975). A identificação de regiões genômicas associadas às características de resistência ao carrapato bovino possibilitará uma maior

eficiência na seleção para esta característica, além de auxiliar no esclarecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência.

O objetivo do presente trabalho foi mapear regiões genômicas relacionadas à resistência a carrapatos em uma população F2 derivada do cruzamento entre duas raças divergentes de bovinos (Gir x Holandês).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carrapato bovino

Os carrapatos são aracnídeos que se alimentam do sangue de vertebrados. Existem dois grupos principais; os Argasidae (pequenos carrapatos), que se alimentam por alguns minutos ou horas, e os Ixodidae (grandes carrapatos), que se alimentam durante dias ou semanas (Samish, 2004). Segundo Jongejan (2004), 80% da fauna de carrapatos pertencem aos Ixodideos (683 espécies), dentro desse grupo encontra-se o gênero *Rhipicephalus*.

A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Fig.1) tem como característica parasitar apenas um hospedeiro, demorando aproximadamente três semanas para completar todo o seu ciclo no animal, que é preferencialmente o bovino. É originária do sudeste da Ásia, porém se espalhou ao longo dos trópicos incluindo Austrália, leste e sul da África, América Central e América do Sul (Jongenan, 2004).

Aproximadamente um bilhão de bovinos, a maioria nos trópicos, estão expostos aos carrapatos (Pegram *et al.,* 1993). O *Rhipicephalus microplus* apresenta distribuição pan-tropical sendo uma das espécies de carrapato com maior importância comercial (Frisch, 1999). Segundo Bowman (2004), estima-se que 80% do rebanho bovino mundial esteja infestado por carrapatos. Como

resultado, o carrapato é o ectoparasita mais importante, do ponto de vista econômico, para toda a produção animal.

Figura 1 – Fotografias mostrando detalhes do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a) Representação de um macho b) Representação de uma fêmea ingurgitada.

O ciclo biológico do *Rhipicephalus (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 três dias e morre após a postura. Em temperaturas ao redor de 28°C e alta umidade relativa (85%), a postura e 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. No hospedeiro, as larvas se fixam em regiões corporais propícias para seu desenvolvimento, tais como: posterior da coxa, perineal, perianal e perivulvar, após sete dias de sua fixação ocorre a muda para ninfas e estas mudam para adultos com marcado dimorfismo sexual em aproximadamente oito dias. A fêmea após o acasalamento começa a alimentação até o ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo, enquanto que o macho permanece no bovino à procura de novas fêmeas.

O carrapato bovino (*R. microplus*) provoca perdas econômicas significativas para a bovinocultura além da transmissão de inúmeros agentes de doenças aos animais infestados. Os prejuízos causados pelos carrapatos são devidos à perda de peso, baixa eficiência alimentar, perdas na qualidade do couro, toxicoses, lesões da pele, anemia e transmissão de agentes patógenos, que provocam grandes enfermidades (Gonzales, 1975; Cordoves, 1997). As perdas econômicas causadas pelos carrapatos são estimadas em mais de 100 milhões de dólares por ano na Austrália, e mais de um bilhão e meio de dólares por ano na América Central e América do Sul (Sabatini *et al*., 2001). Horn (1987) estimou em quase um bilhão de dólares ao ano as perdas econômicas causadas pelo *R. microplus* no Brasil. Foi contabilizada a queda na produção de leite e carne, a mortalidade, a redução da natalidade, os gastos no seu controle e a transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da riquétsia *Anaplasma marginale* (Young & Morzaria, 1986). Além de danificar o couro do bovino, prejudicando sua comercialização, o grande volume de sangue sugado pelos carrapatos após fixação pode causar anemia ao hospedeiro e, dependendo do número de carrapatos infestantes levá-lo à morte (Sonenshine, 1991). Alguns trabalhos sugerem que a presença do carrapato causa uma supressão no apetite dos bovinos, levando então à perda na produtividade (Riek, 1957; O´Kelly & Seifert, 1970).

Os primeiros problemas, causados por agentes de doenças transmitidos por carrapatos, foram relatados durante a introdução de animais de raças européias em áreas previamente infestadas. Esses rebanhos apresentavam uma maior produtividade, porém, eram muito suscetíveis às infestações por carrapatos. Além disso, o transporte dos bovinos infestados por carrapato disseminou esses parasitas para várias regiões onde os mesmos não existiam previamente (Shaw, 1969). De acordo com Furlong (1993), o prejuízo causado pelo carrapato aos bovinos processa-se de várias maneiras. Geralmente é causado pelas teleóginas, que se alimentam de sangue, já que larvas, ninfas e machos são pequenos e, apesar de também se alimentarem de sangue, predominam em sua alimentação a

linfa e os substratos teciduais. Cada fêmea de *R. microplus* ingere entre 0,5 a 3 ml de sangue durante a vida parasitária (Seifert, 1970; Gonzales, 1975).

O *R. microplus* é o principal vetor do *Anaplasma marginale, Babesia bovis e B. bigemina* responsáveis por mortes de bezerros ou de animais adultos que não tenham sido expostos ao carrapato (Veríssimo *et al.*, 1996). Essas doenças formam um complexo com o carrapato, conhecido como tristeza parasitária dos bovinos (TPB).

Os acaricidas foram os primeiros métodos desenvolvidos para o controle do carrapato, porém, são dispendiosos e nem sempre são eficientes, devido ao surgimento de novas cepas de carrapatos resistentes (De la Fuente *et al*., 1992; Wambura *et al*., 1998). Além disso, muitos outros fatores são considerados quanto ao uso de acaricidas: custo dos produtos químicos, trabalho para aplicação, equipamentos necessários, perda na produção de carne e leite, restrições do mercado relacionadas aos resíduos químicos e os efeitos para a saúde humana e para o meio ambiente (Jonsson, 1997). Devido a todos esses inconvenientes, o desenvolvimento de métodos alternativos, para controle do carrapato, torna-se cada vez mais necessário.

Um outro método para o combate ao carrapato é a utilização de vacinas. A primeira vacina foi desenvolvida por Willadsen *et al.* (1995) e foi utilizada comercialmente na Austrália. Esta vacina atua principalmente reduzindo a capacidade reprodutiva das fêmeas. A redução no número de carrapatos é gradual, não apresentando um efeito imediato para o combate ao parasita, sendo então necessário o uso integrado de outras formas de combate, como é o caso do uso de acaricidas. Algumas limitações são encontradas no processo de vacinação, por exemplo, dependendo do tipo da vacina, é recomendada que a mesma seja aplicada a cada seis meses, aumentando os custos e dificultando o manejo dos animais. Outro fator importante é a resposta diferencial encontrada entre os animais, alguns respondem muito mal, contribuindo favoravelmente para a próxima geração de carrapatos.

Os acaricidas são soluções de curto prazo para um problema imediato, e não resolvem o problema do controle de carrapatos a longo prazo. Os primeiros

relatos de infestações por carrapatos datam de 1895 e persistem até os dias atuais, sem uma solução para a erradicação dos mesmos. Em algumas regiões a erradicação foi possível devido ao uso de acaricidas eficazes para os rebanhos presentes, porém, o uso de acaricidas ainda se faz necessário para tratar animais provenientes de regiões infestadas.

O desenvolvimento da resistência a pesticidas é um processo natural de resposta ao estresse ambiental. A genética, assim como as propriedades bioquímicas dos pesticidas, são importantes para a evolução da resistência. A taxa na qual a resistência está envolvida é influenciada por muitos fatores, incluindo o modo de herança, a freqüência dos alelos, a pressão de seleção e a aptidão à resistência. Geralmente, a população com características resistentes aumentará mais rapidamente quando a resistência é herdada como um alelo simples dominante e a pressão de seleção é alta (Kamidi *et al*., 2005).

Existe uma grande variação genética relacionada à resistência a carrapatos entre as raças bovinas, sendo assim, maneiras eficientes para explorar essas variações precisam ser estudadas. O uso exclusivo de animais adaptados aos trópicos para a produção comercial deixa a desejar quando comparado ao alto potencial produtivo das raças bovinas Européias, principalmente na produção de leite. Novas tecnologias genômicas, como a seleção assistida por marcadores, oferecem métodos alternativos para aumentar a resistência em rebanhos de leite e corte (Frisch, 1999).

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

A maioria dos rebanhos comerciais de bovinos de corte na Austrália e na América do Sul, utiliza como método de controle, rebanhos resistentes ao *R. microplus*, como é o caso dos animais *Bos indicus*. Entretanto, as pressões do mercado e a necessidade de aumentar a produtividade acarretaram mudanças

nas estratégias de melhoramento, levando ao aumento no número de animais *Bos taurus* nos rebanhos. O cruzamento de *Bos indicus* com o bovino Europeu (*B. Taurus*) resultou então, em um aumento da suscetibilidade aos carrapatos e a necessidade do uso de outros métodos de controle para minimizar as perdas na produção (Lemos *et al.,* 1985).

A seleção de hospedeiros resistentes é a solução mais eficaz para o controle do carrapato, pois apresenta baixo custo e apresenta-se como uma solução mais duradoura. O controle químico, sozinho ou em combinação com vacinas, aumenta muito o custo e os riscos de contaminação dos produtos, reduzindo assim a competitividade com aqueles gerados em regiões livres de carrapatos. Nos rebanhos leiteiros a situação é mais complexa que nos rebanhos de corte, pois nos rebanhos leiteiros, uma menor variedade de acaricidas está disponível para o uso em vacas em lactação (Foil *et al*., 2004).

Utech *et al.* (1978) observaram em rebanhos Zebuínos, grande proporção de animais com alta resistência ao carrapato, enquanto Villares (1941) havia verificado esta maior resistência do Zebu ao comparar o número de carrapatos encontrados em bovinos de diversas raças. Apenas 5% do total de carrapatos eram originários de animais Zebuínos, 7% de raças crioulas e 88% de raças Européias. Este autor observou também diferença na resistência entre as raças Indianas, com o Nelore sendo mais resistente do que o Gir e o Guzerá. Nagar *et al.* (1978), na Índia, observaram que a raça Hariana é mais resistente ao carrapato do que a Sahival. Por outro lado, o bovino Europeu é menos resistente ao carrapato, provavelmente devido ao pouco contato com este parasita, mas existem raças com diferentes níveis de resistência.

As estimativas de herdabilidade para a resistência a carrapato, obtidas por vários autores, variam de 20 a 49% (Hewetson, 1968; Wharton *et al.*, 1970; Utech, 1979; Teodoro *et al.*, 1984 e Madalena *et al.*, 1985), sugerindo que a seleção para essa característica pode ser promissora. Utech e Wharton (1982), em um experimento de seleção na raça Australian Illawarra Shorthorn (AIS), obtiveram ganhos genéticos consideráveis para resistência, mostrando que a seleção pode ser altamente efetiva.

Rendel (1971) sugeriu a combinação de características de resistência ao carrapato do *Bos indicus*, com a alta produtividade de leite e fertilidade do *Bos taurus*, por meio da utilização de cruzamentos. Isto tem ocorrido intensamente nos países tropicais, ficando a Austrália com a maior concentração de trabalhos de seleção nestas populações mestiças.

O controle de carrapato nos animais domésticos continua sendo feito principalmente com o uso de acaricidas, porém, a possibilidade de associar vacinas juntamente com animais resistentes poderá reduzir drasticamente a dependência existente sobre o controle químico, principalmente nos sistemas extensivos de criação (Jongejan, 2004). A eficiência dos acaricidas e da vacinação é bem maior em rebanhos que apresentam alta resistência, sugerindo que esta combinação seja desejável para o controle do carrapato.

2.2. Mapeamento de QTL

O primeiro passo para pesquisa em genoma é o desenvolvimento de um mapa de ligação saturado que requer um grande número de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares mais utilizados na área genômica são chamados microssatélites (STRs), que são pequenas seqüências repetidas de DNA de 1 a 5 pares de bases. Estão distribuídos ao longo de todo o genoma e apresentam um padrão de herança Mendeliano. O polimorfismo encontrado é devido a um número variável destas repetições que cada indivíduo possui. Os marcadores microssatélites são os mais indicados para a detecção de QTL devido ao grande número existente, à posição conhecida no mapa e ao elevado índice de heterozigosidade (Machado & Martinez, 2001). Estes marcadores têm facilitado a identificação de grande número de genes associados com doenças em humanos, como a diabetes melitus I (Kennedy *et al*., 1995) e a asma (Ober *et al*., 2000).

Os microssatélites são analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo é detectado como diferenças nos tamanhos dos produtos de amplificação submetidos à eletroforese. Estes marcadores podem estar

localizados dentro ou próximo de um gene, porém, a maioria deles estão localizados em segmentos isolados de DNA.

Embora qualquer estrutura de população possa ser usada para mapear marcadores polimórficos, a escolha do delineamento a ser usado deve levar em consideração os aspectos biológicos, econômicos, genéticos e estatísticos. As considerações genéticas estão associadas com os parâmetros genéticos que se deseja estimar, por exemplo, o delineamento F2 permite estimar relações de dominância, já o retrocruzamento não. É muito importante que os progenitores sejam os mais heterozigotos possíveis e a progênie em maior número possível, permitindo assim traçar relações entre os marcadores polimórficos e as características de interesse detectáveis (Soller, 1978).

Grandes famílias de meio-irmãos (rebanhos de bovino de leite) ou mesmo populações experimentais F2, são comumente utilizadas para a geração de mapas de ligação. Um fator a ser considerado é o tamanho da população segregante, que deve ser o maior possível para possibilitar a presença do maior número de combinações genéticas. Por essa razão, o conjunto de famílias utilizadas para o mapeamento do genoma bovino é constituído por um grande número de famílias de irmãos completos, produzidas por múltiplas ovulações com transferência de embriões (MOET - multiple ovulation and embryo transfer) (Bishop *et al.*, 1994; Kappes *et al.*, 1997).

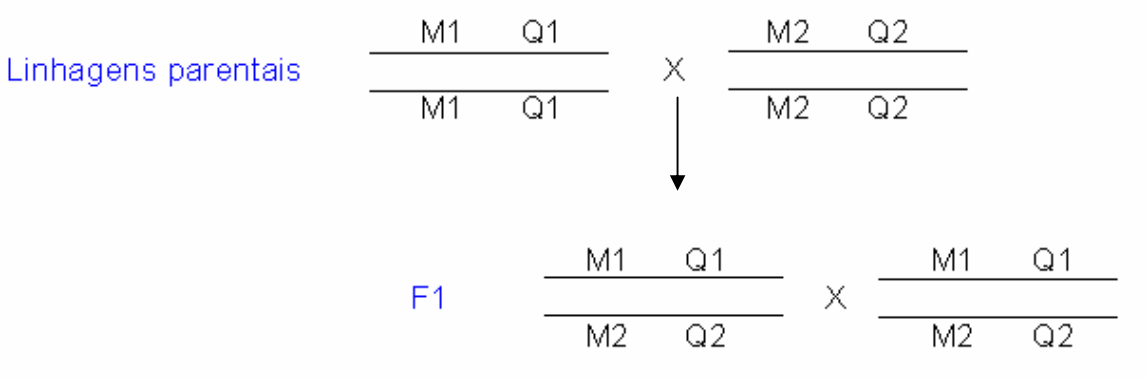
Uma das maneiras para detecção de QTL é o desenvolvimento de populações F2 (Fig. 2) ou retrocruzamento, utilizando progenitores que apresentam grandes diferenças fenotípicas. O cruzamento é feito entre duas populações que tenham alelos fixados, ou estejam próximas da fixação para diferentes alelos, devido a pressões de seleção diferenciadas entre as duas populações. A produção de populações F2 em bovinos é bastante trabalhosa devido ao grande intervalo de gerações, a necessidade de gerar um grande número de fêmeas e o custo para manutenção de toda a população, porém, este delineamento permite a identificação da origem dos alelos. Além disso, o delineamento F2 apresenta algumas vantagens sobre os demais, incluindo a capacidade de avaliar fenótipos importantes que normalmente não seriam

avaliados (ex: temperamento e conversão alimentar), habilidade de avaliar valores produtivos de cruzamentos como uma alternativa para os rebanhos puros e permite o desenvolvimento de rebanhos experimentais que eventualmente podem ser utilizados comercialmente aumentando assim sua utilização entre os criadores (Tassel *et al*., 2001).

Os QTL detectados em populações comerciais normalmente correspondem a fenótipos relacionados a características produtivas, características de conformação ou saúde. Normalmente, as populações utilizadas são grandes famílias de meio-irmãos geradas a partir do uso extensivo da inseminação artificial utilizada nos testes de progênie. Os QTL detectados a partir de populações experimentais (F2 ou retrocruzamentos) ocorrem em uma freqüência menor. Essa diferença pode ser devido ao elevado custo para gerar, manter e fenotipar grandes populações. Entretanto, as diferentes populações experimentais, ou seja, populações desenvolvidas especificamente para o estudo de QTL, fornecem oportunidade de detectar QTL para crescimento, carcaça, qualidade da carne, taxa de ovulação e resistência a parasitas. Algumas dessas características apresentam baixa herdabilidade ou são difíceis ou muito dispendiosas de serem avaliadas em populações comerciais (Sonstegard *et al*., 2004).

Os primeiros mapas genéticos de bovinos foram elaborados em 1994 (Barendse *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 1994). Um mapa mais saturado, de segunda geração, com 1.425 marcadores, foi produzido em 1997 (Kappes *et al.*, 1997). Em 2004, um novo mapa com 3.802 microssatélites foi produzido por Ihara *et al.* (2004).

a)



b)

♂ \ ♀	M1Q1	M2Q2	M1Q2	M2Q1
M1Q1	M1Q1 M1Q1	M2Q2 M1Q1	M1Q2 M1Q1	M2Q1 M1Q1
M2Q2	M1Q1 M2Q2	M2Q2 M2Q2	M1Q2 M2Q2	M2Q1 M2Q2
M1Q2	M1Q1 M1Q2	M2Q2 M1Q2	M1Q2 M1Q2	M2Q1 M1Q2
M2Q1	M1Q1 M2Q1	M2Q2 M2Q1	M1Q2 M2Q1	M2Q1 M2Q1

Recombinantes
Parentais

Figura 2 – a) Esquema utilizado para geração da população F2

b) Quadro representando todos os possíveis genótipos encontrados na F2

A detecção de QTL em populações de cruzamento natural é dificultada pelos efeitos de ambiente e de epistasia. Devido a essa complexidade, diversas estratégias experimentais e ferramentas estatísticas vêm sendo desenvolvidas para maximizar a probabilidade de detecção de QTL (Liu, 1998). Sabendo-se que a característica é herdada, a detecção de QTL pode ser feita pela varredura genômica. Isto envolve a seleção de uma população que esteja segregando para

as características de interesse e a genotipagem da mesma com marcadores polimórficos distribuídos ao longo dos cromossomos. Métodos estatísticos como análise de variância e máxima verossimilhança são usados para determinar se um marcador está associado com alguma característica fenotípica (Beckmann *et al.,*1988; Lander *et al.,* 1989).

O poder de detecção entre um marcador e um QTL é diretamente dependente das seguintes características: fração de recombinação entre o loco marcador e o loco do QTL, número de indivíduos informativos para o marcador (heterozigotos), herdabilidade da característica, efeito do QTL, freqüência dos alelos do QTL, e a significância estabelecida para o erro tipo I (Guimarães, 1999).

Muitos QTL já foram identificados e marcadores moleculares desenvolvidos para doenças como a mieloencefalopatia degenerativa progressiva (Weaver disease) na raça Pardo Suíça (Georges, 1993). O primeiro gene isolado em bovinos, usando o mapa genético como base, foi o da hipertrofia muscular ou musculatura dupla, localizado no cromossomo 2 (Charlier *et al*., 1995). Subseqüentemente, a localização foi delimitada a uma pequena região e, a partir de descobertas sobre o efeito do gene da miostatina no crescimento de camundongos, foi identificado o efeito de mutações nesse gene sobre a musculatura dupla em bovinos (Fries *et al*., 1999). Trabalhos recentes vêm sendo desenvolvidos para identificar os genes responsáveis por efeitos de QTL previamente detectados. Recentemente foi identificada uma mutação funcional no gene DGAT1, localizado no cromossomo 14, responsável por grandes efeitos nas características de produção de leite (Grisart *et al*., 2002). Outra descoberta foi uma mutação no gene receptor do hormônio de crescimento, no cromossomo 20, também associada com a produção de leite e composição (Blott *et al*., 2003).

A maioria dos estudos para identificação de QTL em bovinos de leite estão restritos a características produtivas, como produção de leite e seus constituintes (Bovenhuis & Schrooten, 2002). Os estudos relacionados à saúde são, na maioria dos casos, relacionados a CCS (contagem de células somáticas) e conformação de úbere (Heyen *et al*., 1999; Schrooten *et al*., 2000; Kuhn *et al*., 2003), porém,

poucos estudos foram realizados relacionando QTL com mastite clínica ou outras doenças (Elo *et al*., 1999; Klungland *et al*., 2001; Schulman *et al*., 2002).

Nos últimos anos, uma grande variedade de rebanhos vem sendo testada para a detecção de QTL utilizando diferentes métodos. Nenhum trabalho até o momento reportou a presença de QTL ou genes candidatos para resistência a carrapatos. Alguns QTL para outras características já foram encontrados nos cromossomos 13, 18, 19 e 27, que foram analisados neste trabalho. No cromossomo 13 foram encontrados QTL para produção de leite e proteína (Ashwell *et al.*, 2004), porcentagem de proteína (Mosig *et al.*, 2001) e *score* de células somáticas (SCS) (Rodriguez *et al.*, 2002). No cromossomo 18 foram reportados QTL para produção de leite e proteínas (Olsen *et al.*, 2002), porcentagem de proteínas (Boichard *et al.*, 2003; Mosig *et al.*, 2001), porcentagem de gordura (Ashwell *et al.*, 2004) e SCS (Ashwell *et al.*, 2004; Schrooten *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002). No cromossomo 19 Bennewitz *et al.* (2003) encontrou QTL para produção e porcentagem de gordura e SCS. No cromossomo 27, QTL foram encontrados para produção de leite, proteínas e gordura (Rodriguez *et al.*, 2002; Ron *et al.*, 1998; Ashwell *et al.*, 2004), porcentagem de proteínas (Mosig *et al.*, 2001) e SCS (Rodriguez *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2003). A maior parte dos estudos para detecção de QTL está relacionada com características produtivas, poucos trabalhos levam em consideração aspectos da saúde animal.

2.3. Seleção Assistida por Marcadores

A detecção da resistência a doenças é um dos maiores objetivos dentro das estratégias do melhoramento animal, porém, é difícil de realizar pelos métodos tradicionais. A incidência de doenças é bastante influenciada por fatores de ambiente então, diferenças fenotípicas podem ser, em grande parte, devido a diferenças entre ambientes. Para fazer avaliações fenotípicas mais precisas são necessários desafios artificiais, onde as características de produção são bastante afetadas pelas infecções, porém, as condições ambientais e de manejo são

semelhantes. A seleção para resistência a doenças proporciona o melhoramento na saúde animal, aumentando assim a produtividade e reduzindo a necessidade de intervenções farmacológicas, reduzindo então os custos e retardando o aparecimento de patógenos resistentes (Soller, 1998).

A utilização da genética genômica auxiliando a seleção para resistência a doenças interfere na expressão fenotípica por meio da mudança direta na seqüência do DNA. A seleção de indivíduos, que possuem alelos favoráveis para os genes que controlam a característica em questão, baseada na avaliação direta do seu DNA, é denominada de seleção assistida por marcadores (MAS). Em principio, a MAS pode selecionar para resistência sem a necessidade de desafios e apresenta alta acurácia sem a interferência de fatores ambientais.

A MAS pode trazer inúmeras vantagens aos melhoristas. Touros jovens podem ser selecionados, para marcadores específicos, logo após o nascimento. Desta maneira, os animais de alto mérito genético são mantidos no programa, enquanto os animais de baixo mérito genético podem ser descartados, evitando o custo de manutenção destes animais por vários anos. Com a seleção assistida por marcadores, é possível combinar QTL de duas ou mais raças numa única raça que irá possuir todas as características combinadas. Apesar das vantagens que a seleção assistida por marcadores possibilita, é aconselhável que ela seja realizada conjuntamente com a seleção fenotípica, visando minimizar a chance de descarte de um animal que possua alto potencial genético, devido a possível associação inconsistente entre o marcador e a característica fenotípica (Martinez *et al.,* 2000).

Quando a MAS é comparada à seleção com base no fenótipo, pode ser mais precisa pois não sofre efeito do meio ambiente, não é limitada a um sexo e não requer testes caros ou que necessitam do abate do animal. A MAS pode ser realizada bem cedo na vida do indivíduo, reduzindo o intervalo entre gerações e, ainda, podem incluir todos os indivíduos, mesmo aqueles que ainda não nasceram, por meio da análise do genótipo do embrião e, assim, aumentar a intensidade de seleção (Machado *et al*., 2001). A MAS pode também permitir a identificação e a introgressão de alguns poucos alelos de QTL de raças melhoradas que aumentem a produção em raças nativas adaptadas, ou para

transferência de um loco específico associado à resistência das raças adaptadas ou nativas para as raças melhoradas (Beckmann & Soller, 1987).

A identificação de regiões genômicas associadas à resistência ao carrapato bovino irá possibilitar uma seleção mais eficiente para as características de interesse ao melhoramento. Considerando-se que estas características são difíceis de serem medidas rotineiramente nos animais, espera-se que os marcadores moleculares identificados sejam incorporados aos modelos tradicionais de avaliação, obtendo-se maior eficiência na seleção dos animais. Além de maior eficiência na seleção, a introgressão de genes oriundos de germoplasma adaptado aos trópicos, em animais de raças européias, que apresentam altos índices produtivos, mas baixo índice de resistência, possibilitará a obtenção de animais com alta produção aliada a maior tolerância em condições adversas (Frisch, 1999).

A MAS é bastante interessante para programas de melhoramento que visam características de produção, bem como resistência a doenças. O desenvolvimento da doença compromete a expressão dos caracteres relacionados com produção, portanto a seleção para resistência irá influenciar na seleção para produção. A seleção para a resistência a doenças poder ser realizada com marcadores moleculares, evitando expor o animal à doença e possibilitando seleção eficiente para as características de produção (Soller & Andersson, 1998).

Os marcadores genéticos têm a capacidade de permitir a predição do valor genético de características que apresentam dificuldades no processo de avaliação e, portanto, não fariam parte dos critérios de seleção. A associação entre marcadores e alelos do QTL pode predizer algumas características, sem a necessidade de medição em larga escala dos fenótipos. Além disso, marcadores para características que fazem parte de objetivos individuais de criadores, porém, não fazem parte de todo o conjunto, por exemplo, resistência a uma doença particular ou algum caracter morfológico, pode ser avaliada sem a necessidade da inclusão desses caracteres no esquema de avaliação genética nacional (Davis & DeNise, 1998).

A utilização de marcadores moleculares proporcionará uma maior eficiência técnica e econômica dos sistemas de produção, e também menor uso de químicos para o controle de parasitas, o que certamente garantirá menor contaminação dos produtos (leite e carne) e indiretamente menor dano ao meio ambiente. Porém, para que a MAS possa ser aplicada comercialmente, é necessária a identificação e a caracterização de QTL no genoma, que estejam significativamente associados a caracteres de interesse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Foi utilizada uma população F2 de bovinos, proveniente de cruzamentos entre animais das raças Holandesa e Gir. Em uma primeira fase foram produzidos os indivíduos F1. Para isto foram utilizadas 27 fêmeas Gir (em trabalho de super-ovulação e transferência de embriões) que foram inseminadas com sêmen de quatro touros da raça Holandesa. Estes acasalamentos foram repetidos com a finalidade de se obter 150 animais F1. Destes 150 indivíduos F1 (machos e fêmeas), apenas cinco machos foram escolhidos, baseados no vigor, para serem pais da geração de F2. Sessenta e sete fêmeas F1 foram acasaladas com cinco touros, para constituírem cinco famílias, evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. Cada uma das famílias produziu, por meio da super-ovulação e transferência de embriões, aproximadamente 80 animais F2. Foram produzidos 332 indivíduos F2, ou seja, em média 65 animais F2 por reprodutor F1.

3.2. Avaliação para resistência ao carrapato bovino

A determinação do nível de resistência de cada animal foi feita pela contagem das fêmeas de carrapatos que completaram seu ciclo após a infestação artificial com um número conhecido de larvas. Dada a importância da precisão na avaliação dessa resistência, foram feitas infestações artificiais, em cada animal, com 10.000 larvas, e as contagens foram feitas no dia de queda dos carrapatos, que ocorre no 21º dia após a infestação.

As larvas foram preparadas no Laboratório de Parasitologia da 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 um colar adaptado à região cervical do animal, de modo que as larvas atingissem ambos os lados do corpo. Rapidamente as larvas deslocaram-se e o colar foi removido dentro de duas horas.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, na idade de 13 a 15 meses, em torno de 20 a 30 animais por grupo, sendo mantidos em piquetes, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. As infestações foram feitas preferencialmente durante a primavera, verão e outono, épocas em que a confiabilidade e repetibilidade das contagens são maiores (Utech *et al*., 1978). Todos os animais foram mantidos sob o mesmo manejo durante todo o período de avaliação.

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 se obter o número total de carrapatos por animal. As contagens foram feitas pela manhã, até aproximadamente 9 horas, quando a maioria dos carrapatos se desprendem dos animais.

3.3. Genotipagem com marcadores moleculares

Amostras de sangue de todos os animais (progenitores Gir, progenitores F1 e indivíduos F2) foram coletadas para a extração de DNA. No caso dos

progenitores Holandeses (4 touros), para cada animal, foram obtidas 4 paletas de sêmen importadas dos EUA.

O DNA foi extraído de amostras de sangue, conforme protocolo de Hallerman *et al*. (1988), com modificações. Amostras de aproximadamente 10 ml (com 0,5% EDTA) foram centrifugadas, sendo retirado o anel de células brancas, aproximadamente 500µL de leucócitos para cada amostra. As células do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado e o resíduo celular peletizado por centrifugação. A desintegração foi repetida três vezes ou até a obtenção de um precipitado branco, que foi ressuspendido em 1000µL de tampão de extração com RNAse contendo 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,02% SDS. As amostras então foram incubadas a 37ºC por 2 horas. Adicionou-se 0,2 mg proteinase K para posterior incubação a 50ºC até o dia seguinte. As proteínas foram extraídas duas vezes em 300 µL de fenol e 300 µL clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), duas vezes em 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e então precipitadas com 80 µL de acetato de sódio e 600 µL etanol. O DNA foi solubilizado em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 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.

Para a varredura do genoma, foram utilizados marcadores microssatélites escolhidos do mapa consenso disponibilizado pelo MARC/USDA (*Meat Animal Research Center/ United States Department of Agriculture*), no endereço Internet http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html. A escolha dos marcadores foi baseada na sua posição no mapa (distância entre marcadores em torno de 15 cM), multi-alelismo e mínimo de 50% de heterozigosidade. Ao todo, foram selecionados 21 marcadores microssatélites, visando cobrir os cromossomos 13, 18, 19 e 27, com um espaçamento de 15 a 20 cM, em média, entre os marcadores. Estes marcadores selecionados foram utilizados para a genotipagem de 31 animais parentais, 73 animais F1 e 332 animais F2, totalizando 436 animais.

Para cada marcador, foram testadas três concentrações de $MgCl_2$ (1,5 mM; 2,0 mM e 2,5 mM) e pelo menos quatro temperaturas de anelamento (TA). As reações constaram basicamente de 45ng de DNA genômico; 0,2mM de dNTPs; concentração de $MgCl_2$ definida individualmente; 20mM Tris pH 8,3; 50mM KCl e 0,1 uM de *primer* num volume total de 10uL. Os *primers forward* foram marcados com três tipos de fluorescência (TAM, HEX e FAM) objetivando a montagem de *multiplex* para a injeção das amostras para eletroforese. As amplificações contaram com as seguintes etapas: 94ºC (1min), TA (1min), 72ºC (1min) durante 35 ciclos e uma etapa final para extensão de 45min a 72ºC.

Todas as reações de PCR foram precipitadas utilizando 1 μL de acetato de amônia (7,5M) e 30uL de etanol 90%. As placas foram então centrifugadas durante 30 min. O DNA final foi ressuspendido em 20uL de água.

Os produtos das amplificações foram detectados por eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 500 (Amersham Biosciences Inc.). Os genótipos foram analisados no programa Fragment Profiler (Amersham Biosciences Inc.) e os dados exportados para uma planilha do Excel (Microsoft Corporation).

3.4. Análises estatísticas

Detecção de QTL: As análises para detecção de QTL nos cromossomos estudados foram realizadas por mapeamento de intervalos múltiplos em famílias F_2 utilizando o software QTL Express (http://qtl.cap.ed.ac.uk). Nas populações F2, o QTL é mapeado visando explicar a variação genética entre as linhagens fundadoras, isso implica na pressuposição de que as linhagens parentais possuam alelos alternativos fixados para o QTL em estudo (Seaton *et al.*, 2002).

O programa consiste, primeiramente, na determinação das probabilidades de Identidade-Por-Descendência (IBD) para localização específica das regiões cromossômicas referentes aos dados de marcadores múltiplos e, posteriormente, adequa o modelo estatístico às observações e aos coeficientes de IBD (Seaton *et al*, 2002). Modelos lineares são adequados aos dados fenotípicos pelo uso de um modelo linear geral, ou seja, é permitido que efeitos fixos adicionais e covariáveis

expliquem a variação da característica. No presente trabalho, foram utilizados como efeitos fixos: ano, sexo, tipo de pelagem, cor da pelagem e como covariável: idade à contagem dos carrapatos. O programa realiza testes de permutação (Church e Doerge, 1994) para definir valores de significância (1% e 5%) e procedimentos de permutação com re-amostragens (*bootstrap*) para a definição do intervalo de confiança na localização de cada QTL. O modelo incluiu os efeitos aditivos e de dominância.

Freqüência alélica, heterozigosidade e PIC: O cálculo da freqüência alélica, heterozigosidade esperada (He) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram obtidos com a utilização do programa Cervus v.2.0 (Marshall *et al.*, 1998).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2 p_j^2 \quad ; \quad H = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$$

Transformações: A contagem do número de carrapatos foi transformada, visando à normalização dos dados, utilizando o logaritmo decimal da contagem de carrapatos + 1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos marcadores moleculares

Os marcadores microssatélites foram escolhidos visando cobrir os cromossomos 13, 18, 19 e 27, respeitando o intervalo aproximado de 15 cM, com respectivamente 4, 7, 6 e 4 marcadores (Tabela 1). Em determinadas regiões dos cromossomos não foi possível selecionar marcadores com o espaçamento de 15cM devido à ausência de marcadores nessas regiões ou marcadores pouco polimórficos, surgindo assim espaçamentos de até 30cM como os encontrados entre os marcadores 13-2/13-3, 13-3/13-5 e 19-2/19-3 (Tabela 1).

Para a otimização das reações de PCR, foram estabelecidas, para cada marcador, as condições ótimas de amplificação, incluindo concentração de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento. As concentrações de $MgCl_2$ ótimas, para todos os 21 marcadores, foram de 1,5 e 2,0 mM de $MgCl_2$ (Tabela 2). A concentração de $MgCl_2$ interfere na especificidade da reação de PCR, ou seja, uma concentração excessivamente alta diminui a especificidade da reação de PCR. Para manter as condições ótimas de amplificação, deve-se evitar a adição de EDTA (agentes quelantes) ou grupamentos com carga negativa (fosfatos) que possam vir a diminuir os níveis de Mg^{2+} livre na reação (Sambrook *et al.*, 1986). Mesmo seguindo todas as especificações técnicas e variando a concentração de $MgCl_2$ e a temperatura de anelamento o marcador 19-1 não funcionou, portanto foi

sintetizado o marcador 19-1B para substituí-lo. O mesmo ocorreu com o marcador 13-4, que foi substituído pelo 13-5.

A etapa de precipitação das amostras foi fundamental para permitir uma ótima injeção dos fragmentos no sequenciador automático. Essa etapa de precipitação visa retirar os produtos restantes da reação de PCR para a obtenção de uma solução contendo apenas DNA e água, o que favorece a injeção das amostras em cada capilar.

Tabela 1 – Localização dos marcadores e espaçamento representada em cM, baseado no mapa do MARC/USDA.

Marcadores	Localização (cM)	Espaçamento (cM)
	Cromossomo 13	
13-1	0,0	0,0
13-2	19,5	19,5
13-3	49,5	30,0
13-5	79,5	30,0
	Cromossomo 18	
18-0	1,2	0,0
18-1	10,8	9,6
18-2	26,2	15,4
18-3	42,3	16,1
18-4	57,0	14,7
18-5	61,0	4,0
18-6	81,4	20,4
	Cromossomo 19	
19-1B	0,0	0,0
19-2	15,9	15,9
19-3	46,5	30,6
19-4	65,7	19,2
19-5	78,6	12,9
19-6	98,4	19,8
	Cromossomo 27	
27-1	0,0	0,0
27-2	19,9	19,9
27-3	40,9	21,0
27-4	59,7	18,8

Tabela 2 - Temperatura de anelamento e concentração de $MgCl_2$ para cada um dos 21 *primer*s utilizados, distribuídos ao longo dos 4 cromossomos.

Marcador	T (ºC)	$MgCl_2$ (mM)
13-1	54	1,5 mM
13-2	52	1,5 mM
13-3	54	1,5 mM
13-5	62	1,5 mM
18-0	54	1,5 mM
18-1	52	2,0 mM
18-2	54	2,0 mM
18-3	52	2,0 mM
18-4	54	1,5 mM
18-5	54	1,5 mM
18-6	48	2,0 mM
19-1B	50	1,5 mM
19-2	54	1,5 mM
19-3	54	1,5 mM
19-4	54	1,5 mM
19-5	52	2,0 mM
19-6	54	1,5 mM
27-1	48	2,0 mM
27-2	54	1,5 mM
27-3	50	2,0 mM
27-4	54	1,5 mM

O *scoring* dos alelos dos marcadores microssatélites foi feito primeiramente para a população parental, onde foram identificados os alelos que poderiam estar presentes nas demais populações (F1 e F2). Os alelos, não encontrados na população parental, foram eliminados para facilitar o *scoring*, gerando um *bin set*

ajustado que foi exportado para realizar o *scoring* das populações F1 e F2 (Figura 3).

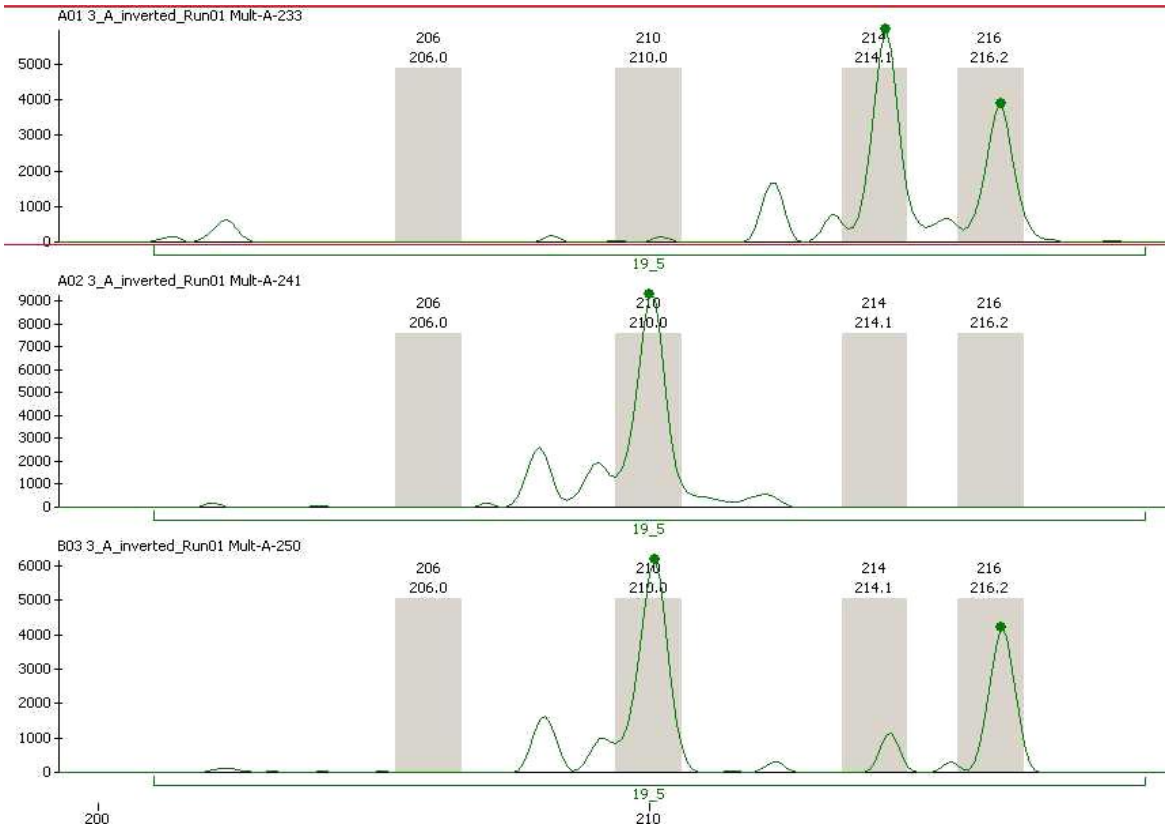


Figura 3 - Padrão eletroforético obtido com o *primer* 19-5. Representação gráfica obtida com o programa *Fragment Profiler* onde os dados foram analisados. O animal superior é heterozigoto (214, 216); o intermediário é homozigoto (210, 210) e o inferior é heterozigoto (210, 216). Os alelos 202, 204, 208, 212 e 218 foram eliminados do *bin set* que foi utilizado para analisar as populações F1 e F2.

Todas as três populações (parentais, F1 e F2) foram genotipadas para os 21 marcadores, porém, ocorreram algumas falhas no processo de amplificação, o que não interferiu nos resultados finais. O marcador 27-3 foi o que apresentou a maior quantidade de falhas sendo necessário repetir várias reações de PCR, mesmo assim, este apresentou um total de 14% na população F2. O cromossomo com menor número de falhas foi o 19 com apenas 3,7% das amostras não

amplificadas, já o cromossomo 27 apresentou 9,2% de falhas, isso ocorreu devido à dificuldade de amplificação do marcador 27-3 (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de falhas encontradas para cada uma das populações genotipadas (P= parental que corresponde a população Gir e Holandês, F1 e F2).

Cromossomos	Marcadores	% Falhas			
		Parentais	F1	F2	Total por Cromossomo
13	13-1	0	0	3	4,8
	13-2	0	7	6	
	13-3	4	22	4	
	13-5	4	2	5	
18	18-0	0	2	5	5,1
	18-1	4	0	3	
	18-2	0	0	4	
	18-3	7	7	8	
	18-4	0	28	3	
	18-5	4	29	2	
	18-6	0	0	2	
19	19-1B	4	0	4	3,7
	19-2	0	5	4	
	19-3	4	2	4	
	19-4	4	3	4	
	19-5	0	3	2	
	19-6	4	16	4	
27	27-1	0	7	5	9,2
	27-2	10	0	4	
	27-3	10	20	14	
	27-4	23	11	6	

4.2. Freqüência alélica, Heterozigosidade e Conteúdo de informação polimórfica

A análise dos 21 marcadores para os 4 cromossomos resultou em um total de 153 alelos, uma média de 7,28 alelos por marcador. O marcador com maior número de alelos foi o 19-1B, que apresentou 13 alelos, já o marcador 19-6 apresentou apenas 3 alelos (Tabela 4). De maneira geral, o número de alelos encontrados na população F2, do presente trabalho, foi menor que o número de alelos reportados no mapa do MARC (Tabela 4). Isto ocorreu, muito provavelmente, devido ao fato de que o mapa do MARC é um mapa de referência que utilizou várias raças taurinas e duas Zebuínas, entre elas: Gelbvieh, Simmental, Piedmontese, Longhorn, Nellore, Hereford, Angus, Brahman (Bishop *et al.* 1994), aumentando grandemente a diversidade alélica encontrada. Na população F2, do presente trabalho, foram utilizadas apenas duas raças, Gir e Holandês, e também um menor número de animais fundadores. No entanto, os marcadores 18-0, 19-2, 27-2 e 27-4 apresentaram um número maior de alelos na população F2 em relação a população de mapeamento do MARC (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação entre a população de mapeamento utilizada pelo MARC e a população F2 do presente trabalho referente ao número de alelos e tamanho mínimo e máximo encontrado para cada um dos marcadores.

Marcadores	MARC*	Embrapa	MARC*		Embrapa	
	N de alelos	N de alelos	Min	Max	Min	Max
13-1	9	4	92	116	93	121
13-2	12	8	272	302	272	302
13-3	7	8	108	130	112	130
13-5	15	11	155	183	157	181
18-0	7	9	94	120	110	124
18-1	5	5	115	123	118	124
18-2	11	10	118	146	120	146
18-3	9	7	139	155	145	159
18-4	13	9	155	185	166	180
18-5	8	6	230	246	232	246
18-6	13	8	76	102	81	101
19-1B	14	13	158	300	148	290
19-2	5	6	98	114	104	112
19-3	8	8	219	233	220	250
19-4	5	5	154	174	160	170
19-5	6	4	205	215	206	216
19-6	4	3	218	226	217	223
27-1	10	10	159	187	156	184
27-2	5	6	115	125	116	130
27-3	11	7	162	180	165	187
27-4	5	6	152	164	156	168

*Dados retirados do site http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html em 07/08/2006

O tamanho dos alelos oscilou dentro do esperado para a maioria dos marcadores baseado nos dados provenientes do MARC, porém, alguns alelos

foram encontrados fora da faixa esperada (Tabela 4). Para o marcador 13-1 foi identificado o alelo 121; para o marcador 18-0 foi identificado um novo alelo 124; para o marcador 18-3 foi reportado o alelo 157 e 159; para marcador 19-1B foram detectados dois novos alelos, o 148 e 150; para o marcador 19-3 foram localizados os alelos 240 e 250 e para o marcador 27-1 o alelo encontrado foi o 126. A maioria dos alelos distintos encontrados foram oriundos da população Gir, evidenciando a diversidade existente entre raças Taurinas e Zebuínas e demonstrando a necessidade de maiores estudos dentro deste grupo. O marcador 27-2 foi o único que apresentou um alelo novo (130) compartilhado entre os animais das raças Holandesa e Gir. O marcador 27-3 apresentou o alelo 187 não descrito, estando este presente apenas no Holandês, o que também ocorreu com o alelo 168 do marcador 27-4.

A diferença encontrada, com relação ao tamanho de um par de base, entre a população em estudo e aquela gerada pelo MARC é devido, provavelmente, às diferentes metodologias e aparelhos utilizados para a genotipagem. Toda a genotipagem do presente trabalho foi realizada em seqüenciador automático de ótima precisão, já algumas genotipagens realizadas pelo MARC foram feitas em géis de poliacrilamida, corados com radioisótopos, o que pode ter comprometido a resolução do resultado (Bishop, 1994). Por exemplo, no caso do marcador 19-5, é possível que o alelo reportado pelo MARC como sendo 205 é o mesmo que o encontrado no presente estudo como sendo 206, situações semelhantes foram encontradas nos marcadores 13-1, 18-1, 18-4, 18-6, 19-3, 19-6, 27-2 e 27-3.

O número total de alelos e a freqüência dos mesmos variaram dentro das quatro populações (Tabela 5). Em todos os marcadores foram observados alelos com freqüência acima de 20%, indicando que a distribuição de freqüências alélicas não é uniforme entre locos. Para os marcadores 13-1 e 19-6, foi encontrado apenas um alelo na população Holandesa, sendo que esta apresentou uma média de apenas 2,9 alelos/marcador. A população Gir apresentou maior variabilidade, sendo observada uma média de 5,7 alelos/marcador. A grande diferença no número de alelos entre essas duas populações, muito provavelmente é devido à diferença no número de animais amostrados em cada raça, já que

foram avaliados apenas quatro animais Holandeses e 27 animais Gir. Para as populações F1 e F2, a média encontrada foi de 6,8 alelos/marcador. Houve grande variação nos valores de freqüência alélica encontrada dentro das raças parentais, demonstrando a grande diferença existente entre ambas. Para os marcadores 19-1B e 18-4 todos os alelos presentes na população Holandesa não foram encontrados na população Gir.

Tabela 5 - Freqüência alélica para 21 marcadores microssatélites encontrada nas populações Gir, Holandês, F1 e F2.

Marcador	Alelo	População			
		HOL	GIR	F1	F2
13-1	1	0,000	0,593	0,322	0,344
	2	0,000	0,167	0,089	0,062
	3	1,000	0,148	0,568	0,587
	4	0,000	0,093	0,021	0,008
13-2	1	0,125	0,000	0,037	0,033
	2	0,750	0,000	0,412	0,443
	3	0,125	0,074	0,125	0,108
	4	0,000	0,222	0,125	0,072
	5	0,000	0,167	0,081	0,102
	6	0,000	0,426	0,206	0,237
	7	0,000	0,074	0,015	0,005
	8	0,000	0,037	0,000	0,000
13-3	1	0,000	0,365	0,167	0,189
	2	0,000	0,346	0,158	0,194
	3	0,000	0,038	0,000	0,000
	4	0,625	0,019	0,281	0,298
	5	0,250	0,000	0,158	0,172
	6	0,125	0,000	0,061	0,028
	7	0,000	0,115	0,053	0,014
	8	0,000	0,115	0,123	0,105
13-5	1	0,000	0,212	0,056	0,090
	2	0,000	0,135	0,042	0,011
	3	0,000	0,019	0,007	0,006
	4	0,000	0,212	0,132	0,116
	5	0,000	0,019	0,000	0,000
	6	0,000	0,096	0,090	0,036
	7	0,000	0,038	0,007	0,002
	8	0,000	0,250	0,125	0,148
	9	0,000	0,019	0,042	0,094
	10	0,875	0,000	0,410	0,439
	11	0,125	0,000	0,090	0,058

Marcador	Alelo	População			
		HOL	GIR	F1	F2
18-0	1	0,000	0,019	0,000	0,000
	2	0,000	0,222	0,083	0,082
	3	0,000	0,222	0,090	0,047
	4	0,250	0,333	0,271	0,319
	5	0,625	0,074	0,431	0,450
	6	0,000	0,037	0,021	0,013
	7	0,125	0,000	0,056	0,022
	8	0,000	0,056	0,007	0,006
	9	0,000	0,037	0,042	0,060
18-1	1	0,375	0,173	0,247	0,272
	2	0,375	0,692	0,527	0,455
	3	0,250	0,000	0,144	0,158
	4	0,000	0,115	0,082	0,115
	5	0,000	0,019	0,000	0,000
18-2	1	0,000	0,019	0,007	0,003
	2	0,000	0,389	0,171	0,238
	3	0,000	0,037	0,007	0,002
	4	0,000	0,315	0,199	0,066
	5	0,250	0,000	0,096	0,106
	6	0,125	0,000	0,068	0,132
	7	0,125	0,148	0,123	0,065
	8	0,000	0,093	0,075	0,167
	9	0,375	0,000	0,185	0,188
	10	0,125	0,000	0,068	0,033
18-3	1	0,000	0,140	0,096	0,144
	2	0,125	0,000	0,044	0,091
	3	0,875	0,040	0,493	0,442
	4	0,000	0,020	0,007	0,002
	5	0,000	0,520	0,257	0,214
	6	0,000	0,260	0,096	0,102
	7	0,000	0,020	0,007	0,005
18-4	1	0,000	0,130	0,042	0,097
	2	0,375	0,000	0,174	0,226
	3	0,000	0,185	0,104	0,090
	4	0,000	0,056	0,042	0,011
	5	0,000	0,148	0,083	0,042
	6	0,000	0,407	0,181	0,176
	7	0,000	0,019	0,000	0,000
	8	0,000	0,056	0,049	0,108
	9	0,625	0,000	0,326	0,250
18-5	1	0,000	0,019	0,007	0,011
	2	0,000	0,404	0,183	0,204
	3	0,500	0,096	0,359	0,315
	4	0,125	0,288	0,176	0,174
	5	0,375	0,115	0,225	0,269
	6	0,000	0,077	0,049	0,028
18-6	1	0,000	0,741	0,432	0,383
	2	0,000	0,111	0,027	0,078
	3	0,125	0,130	0,110	0,128
	4	0,000	0,019	0,000	0,000
	5	0,125	0,000	0,062	0,081
	6	0,125	0,000	0,082	0,032
	7	0,125	0,000	0,062	0,056
	8	0,500	0,000	0,226	0,241

Tabela 5, Cont.

Marcador	Alelo	População			
		HOL	GIR	F1	F2
19-1B	1	0,000	0,212	0,116	0,098
	2	0,000	0,038	0,041	0,140
	3	0,000	0,231	0,062	0,037
	4	0,000	0,308	0,178	0,146
	5	0,000	0,077	0,041	0,016
	6	0,000	0,038	0,021	0,014
	7	0,125	0,000	0,062	0,106
	8	0,125	0,000	0,041	0,022
	9	0,500	0,000	0,253	0,224
	10	0,000	0,019	0,014	0,019
	11	0,000	0,038	0,007	0,008
	12	0,000	0,038	0,027	0,008
	13	0,250	0,000	0,137	0,165
19-2	1	0,000	0,037	0,057	0,013
	2	0,625	0,000	0,293	0,234
	3	0,250	0,111	0,250	0,403
	4	0,000	0,537	0,271	0,262
	5	0,125	0,093	0,093	0,069
	6	0,000	0,222	0,036	0,020
19-3	1	0,125	0,000	0,076	0,098
	2	0,000	0,192	0,083	0,051
	3	0,125	0,250	0,104	0,130
	4	0,000	0,308	0,160	0,166
	5	0,375	0,154	0,333	0,317
	6	0,375	0,000	0,194	0,207
	7	0,000	0,019	0,007	0,000
	8	0,000	0,077	0,042	0,031
19-4	1	0,000	0,058	0,000	0,000
	2	0,000	0,846	0,394	0,400
	3	0,375	0,077	0,232	0,294
	4	0,250	0,019	0,183	0,111
	5	0,375	0,000	0,190	0,195
19-5	1	0,000	0,037	0,000	0,000
	2	0,125	0,370	0,261	0,302
	3	0,125	0,556	0,338	0,301
	4	0,750	0,037	0,401	0,397
19-6	1	0,000	0,558	0,250	0,154
	2	0,000	0,058	0,008	0,003
	3	1,000	0,385	0,742	0,843

Marcador	Alelo	População			
		HOL	GIR	F1	F2
27-1	1	0,000	0,185	0,088	0,060
	2	0,000	0,019	0,015	0,002
	3	0,000	0,222	0,074	0,070
	4	0,000	0,241	0,110	0,145
	5	0,875	0,074	0,507	0,523
	6	0,000	0,074	0,059	0,079
	7	0,000	0,037	0,007	0,002
	8	0,000	0,037	0,007	0,008
	9	0,000	0,111	0,103	0,103
	10	0,125	0,000	0,029	0,009
27-2	1	0,000	0,000	0,000	0,015
	2	0,000	0,146	0,084	0,124
	3	0,000	0,583	0,237	0,183
	4	0,250	0,000	0,122	0,041
	5	0,250	0,208	0,160	0,156
	6	0,500	0,062	0,397	0,480
27-3	1	0,000	0,021	0,042	0,075
	2	0,125	0,000	0,076	0,131
	3	0,000	0,062	0,017	0,023
	4	0,125	0,229	0,151	0,106
	5	0,000	0,542	0,277	0,211
	6	0,625	0,146	0,361	0,342
	7	0,125	0,000	0,076	0,112
27-4	1	0,000	0,674	0,292	0,381
	2	0,000	0,065	0,062	0,035
	3	0,000	0,130	0,100	0,056
	4	0,000	0,087	0,023	0,002
	5	0,500	0,043	0,277	0,234
	6	0,500	0,000	0,246	0,292

HOL = Holandês

A heterozigosidade esperada e os valores de PIC para todas as populações estão representados na Tabela 6. Pela análise dos valores encontrados na população F2, foi verificado que a maior heterozigosidade foi observada para o marcador 19-1B e a menor heterozigosidade foi observada para o marcador 19-6, com valores de 0,94 e 0,32 respectivamente. A heterozigosidade média dos marcadores na população F2 foi de 0,74. O maior valor de PIC, levando em consideração apenas a população F2, foi de 0,84 (19-1B) e o menor valor foi de 0,23 (19-6), sendo que a média dos valores de PIC foi de 0,67. Botstein, *et al*. (1980) determinaram alguns graus para classificar as variações genéticas, desse modo, um PIC maior que 0,5 é considerado altamente polimórfico, entre 0,25 e 0,5 é considerado moderadamente polimórfico e menor que 0,25 é considerado pouco polimórfico, logo, os marcadores utilizados no presente trabalho podem ser considerados altamente polimórficos, com exceção do marcador 19-6 que apresentou um PIC de 0,23. O valor de PIC é um dos índices mais utilizados para determinar o grau de polimorfismo de um marcador (Vaiman *et al.* 1994; Peelman *et al.* 1998), sendo que a aplicabilidade dos marcadores moleculares está diretamente relacionada com o maior grau de polimorfismo dos mesmos.

Apesar do pequeno número de animais fundadores utilizados, considerando apenas a raça Gir, é possível selecionar alguns marcadores que apresentaram alto grau de heterozigosidade esperada e PIC, para utilizá-los em estudos de genealogia dentro da raça. A alta heterozigosidade esperada, na maioria dos marcadores analisados, indica que os marcadores possuem um alto poder de discriminação individual para a raça, sugerindo um alto potencial para utilização dos mesmos em testes de identidade genética e paternidade. Por exemplo, os marcadores 13-5, 19-1B e 27-1 apresentam grandes possibilidades de serem utilizados em testes de paternidade, pois possuem muitos alelos, além dos valores de He e PIC demonstrarem um alto grau de polimorfismo.

Tabela 6 – Valores de He e PIC obtidos nas populações Gir, Holandês, F1 e F2 para 21 marcadores microssatélites.

	Populações							
Marcador	**Hol**		**Gir**		**F1**		**F2**	
	He	**PIC**	**He**	**PIC**	**He**	**PIC**	**He**	**PIC**
13-1	0,00	0,00	0,74	0,55	0,86	0,49	0,57	0,45
13-2	0,50	0,37	0,85	0,69	0,96	0,72	0,73	0,68
13-3	0,50	0,47	0,77	0,67	1,00	0,80	0,81	0,77
13-5	0,25	0,20	0,69	0,79	1,00	0,76	0,76	0,73
18-0	0,75	0,47	0,85	0,75	0,88	0,68	0,70	0,63
18-1	0,75	0,58	0,50	0,43	0,73	0,58	0,74	0,63
18-2	0,75	0,71	0,59	0,67	0,97	0,84	0,88	0,82
18-3	0,25	0,20	0,80	0,59	0,94	0,63	0,75	0,68
18-4	0,25	0,36	0,78	0,72	1,00	0,78	0,89	0,80
18-5	0,25	0,51	0,81	0,68	0,85	0,71	0,79	0,71
18-6	1,00	0,65	0,41	0,39	1,00	0,70	0,77	0,73
19-1B	0,50	0,61	0,73	0,77	0,99	0,84	0,94	0,84
19-2	0,75	0,47	0,59	0,60	0,97	0,73	0,70	0,66
19-3	0,75	0,63	0,73	0,74	0,89	0,78	0,85	0,77
19-4	0,50	0,58	0,31	0,26	0,89	0,67	0,79	0,65
19-5	0,50	0,37	0,37	0,46	0,90	0,58	0,67	0,59
19-6	0,00	0,00	0,65	0,44	0,52	0,32	0,32	0,23
27-1	0,25	0,20	0,78	0,81	0,94	0,68	0,71	0,65
27-2	0,50	0,56	0,38	0,54	0,76	0,71	0,61	0,63
27-3	0,50	0,52	0,58	0,58	0,93	0,72	0,72	0,76
27-4	1,00	0,38	0,57	0,49	0,97	0,72	0,75	0,66

Hol = Holandês;

4.3. Análise de variância

Foram avaliados, de 2001 a 2006, 330 animais F2 (Holandês x Gir), distribuídos em 15 grupos contemporâneos, cuja contagem individual variou de zero a 792 carrapatos. Teodoro (2006) estimou a herdabilidade da população em questão e obteve um valor de 0,21±0,12 para o logaritmo da contagem de carrapato + 1. Por meio da análise de variância (Tabela 7), observou-se que as fontes de variação: ano, sexo, tipo de pelagem, cor da pelagem e idade a contagem, influenciaram o logaritmo da contagem de carrapato +1. Com base nas análises fenotípicas da população F2 (Tabela 8) observou-se que os machos possuem maior número de carrapatos que as fêmeas. Alguns autores observaram os mesmos efeitos de sexo e sugeriram que isso pode ser devido às diferenças hormonais (Stear *et al*., 1990, Veríssimo *et al*., 1997). Da mesma forma, o tipo de pelagem e a coloração apresentaram efeitos significativos no logaritmo da contagem de carrapato +1 por animal. Observou-se grande variação desses efeitos, sendo que os valores das médias dos quadrados mínimos ficaram entre 2,58 (EP= 0,09) a 3,62 (EP=0,22) para tipo de pelagem e entre 2,66 (EP=0,19) a 3,31 (EP=0,11) para coloração da pelagem. Animais com pelagem curta apresentaram menor número de carrapatos quando comparados aos de pelagem longa. Uma possível explicação é que o carrapato tem maior dificuldade de se fixar a este tipo de pelagem e porque é mais fácil para o animal livrar-se do carrapato (Veríssimo *et al*., 1996). Além disso, animais com pelagem mais clara apresentaram menos carrapatos quando comparados aos animais mais escuros. Uma possível explicação para o fato é que, em animais escuros, os carrapatos estão protegidos contra os predadores, tais como pássaros.

Tabela 7 – Análise de variância indicando os valores de quadrado médio (QM), graus de liberdade (GL) e nível de significância para o logaritmo da contagem de carrapato + 1

Fonte de variação	**GL**	**QM**
Ano	3	9,24**
Estação	1	0,32
Sexo	1	6,83**
Tipo de pelagem	3	7,49**
Cor da pelagem	3	4,85**
Idade a contagem	1	7,25**

** $p < 0.01$

Tabela 8 - Média dos quadrados mínimos (MQM) e erro padrão (EP) para o logaritmo da contagem de carrapato + 1, com os seguintes efeitos: ano, estação, sexo, tipo da pelagem e cor da pelagem

Efeitos	MQM	EP
Ano		
2000	3,05	0,14
2001	3,26	0,11
2002	3,54	0,12
2003	2,33	0,20
Estação		
Outubro - Março	3,01	0,11
Abril - Setembro	3,08	0,09
Sexo		
Fêmea	2,89	0,10
Macho	3,19	0,10
Tipo pelagem		
Curta e lisa	2,58	0,09
Curta e enrolada	2,97	0,14
Longa e lisa	3,01	0,12
Longa e enrolada	3,62	0,22
Cor pelagem		
Totalmente branca	2,66	0,19
Mais de 75% branca	2,92	0,12
50% a 75%branca	3,31	0,11

4.4 Detecção de QTL

No total, 332 animais F2 foram genotipados, porém, 47 animais não possuíam ainda dados referentes à resistência ao carrapato ou morreram antes de serem fenotipados, portanto, apenas 285 foram utilizados nas análises finais de associação entre os dados genotípicos e fenotípicos. Os estudos de associação realizados a partir da varredura genômica para os cromossomos 13, 18, 19 e 27 indicam a presença de dois QTL, um no cromossomo 18 e outro no 27.

O QTL encontrado no cromossomo 18 apresenta um efeito aditivo e dominante ($P<0,01$), para resistência a carrapato localizado no final do cromossomo (Figura 4). O componente aditivo explicaria 1,8% da variação fenotípica e o componente dominante explicaria 3,16%. A média do logaritmo da contagem +1 para o cromossomo 18 foi de 3,94, sendo que o componente dominante está interferindo com uma redução de 0,39 na média. O componente aditivo provoca um aumento de 0,21 na média (Tabela 10). Não está clara qual é a origem da resistência para este QTL, visto que ambas as raças compartilham alelos que estão interferindo na resistência ou suscetibilidade nos animais F2.

Um possível QTL também foi encontrado no cromossomo 27 (Figura 5) com efeito aditivo ($P< 0,07$). O efeito fenotípico explicado por este QTL equivale a 1,74% da variação total. A média do logaritmo da contagem +1 para o cromossomo em questão foi de 3,65, sendo que o componente aditivo provoca um aumento de 0,23 no número médio de carrapatos (Tabela 9).

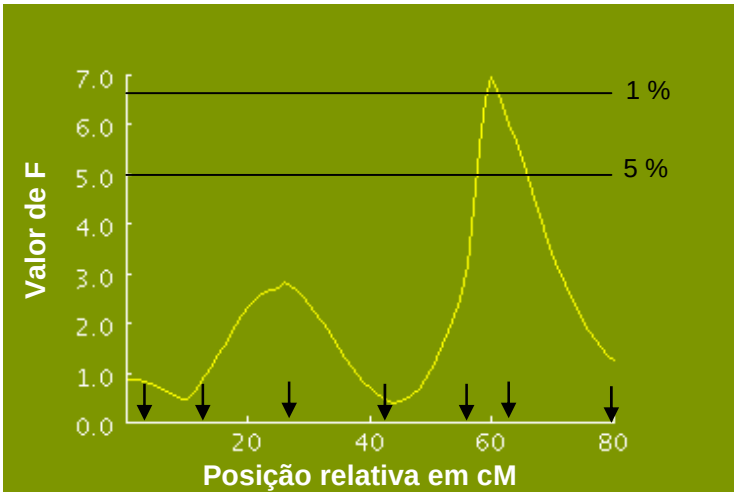


Figura 4 - Localização do QTL encontrado no cromossomo 18 e o valor do F calculado. As setas indicam a posição dos marcadores

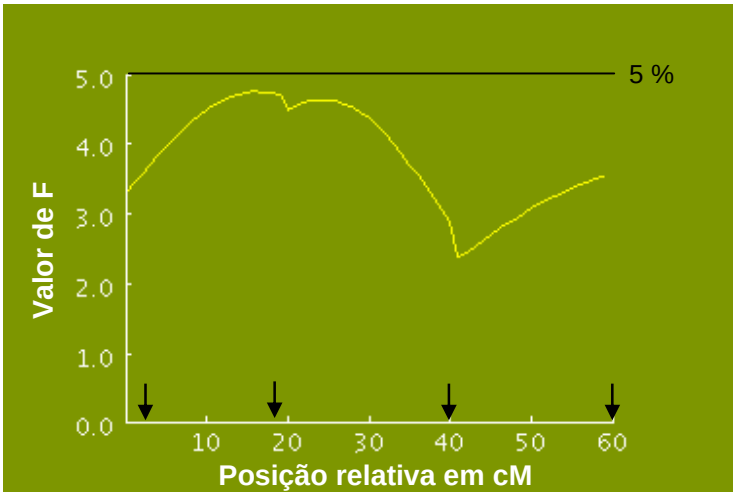


Figura 5 - Localização do QTL encontrado no cromossomo 27 e o valor do F calculado. As setas indicam a posição dos marcadores

Tabela 9 – Média do logaritmo da contagem de carrapato +1 e as mudanças causadas pelos efeitos aditivo e dominante para os QTL identificados nos cromossomo 18 e 27.

Cromossomo	Fonte	Estimativa	Erro Padrão
18	Média	3,947	0,396
	Efeito aditivo	0,212	0,093
	Efeito Dominante	-0,388	0,130
27	Média	3,653	0,394
	Efeito aditivo	0,228	0,104

Os valores de F para todos os cromossomos estão descritos na Tabela 11. Assim como mencionado anteriormente, apenas os cromossomos 18 e 27 apresentaram valores significativos, sendo que o QTL encontrado no cromossomo 18 apresentou um valor de F significativo a 1% e o QTL encontrado no cromossomo 27 apresentou um valor de F significativo a 7%.

Tabela 10 – Valores de F para os efeitos aditivo (A) e aditivo + dominante (A + D) para cromossomos 13, 18, 19 e 27.

Cromossomo	Modelo Aditivo			Modelo Aditivo + Dominante		
	F_A	$F_{5\%}$	$F_{1\%}$	F_{A+D}	$F_{5\%}$	$F_{1\%}$
13	2,74	6,39	9,69	3,03	4,85	6,53
18	4,94	7,03	10,33	6,96**	5,03	6,76
19	2,42	6,86	10,08	2,2	4,88	6,82
27	4,75#	5,93	9,10	2,74	4,41	6,45

** P<0,01; # P<0,07

O mapeamento fino visando a inclusão de marcadores adicionais, nas regiões onde foram detectados os QTL para resistência ao carrapato, poderá

aumentar o nível de significância para os QTL já detectados no presente trabalho além de encurtar o intervalo em cM para o QTL. Desta maneira, a aplicabilidade da seleção assistida por marcadores aumenta grandemente, pois existirá uma menor probabilidade de ocorrência de *crossing overs* entre o marcador e o QTL, uma vez que o intervalo será menor.

Também, é de suma importância a realização de uma validação dos resultados, por meio da análise dos marcadores encontrados em diferentes rebanhos ou populações que tenham variabilidade para resistência ao carrapato, sendo que esta análise pode fornecer informações adicionais sobre o controle genético da característica em questão. Esta validação poderia ser feita em animais da raça Girolando, que formam cerca de 80% do rebanho leiteiro brasileiro e que seria o mercado imediato para a utilização da seleção assistida por marcadores.

O refinamento da posição onde o QTL foi identificado em desequilíbrio de ligação permitirá a localização mais precisa dos limites do QTL, permitindo assim a identificação de genes ortólogos em segmentos humanos ou de camundongos, que poderá fornecer uma lista de genes candidatos que podem explicar o efeito dos QTL para resistência ao carrapato. Hayes (1995) e Chowdhary (1996) identificaram, no cromossomo 18 bovino, pontos de quebras cromossômicas que representam fragmentos conservados relacionados aos cromossomos 16 e 19 de humanos. Essas informações poderão auxiliar os estudos subseqüentes visando à identificação e o entendimento dos mecanismos gênicos envolvidos no fenótipo em questão.

Com o progresso do seqüenciamento genômico bovino, as pesquisas baseadas nos BACs contendo marcadores para QTL poderão ser uma ótima estratégia para a descoberta de genes candidatos e análise de expressão gênica. Na ausência do seqüenciamento completo do genoma bovino, os mapas comparativos entre bovinos e humanos são as ferramentas mais eficientes para identificação e localização de genes candidatos que poderão estar contribuindo para a variação em um determinado QTL em bovinos (Connor *et al*., 2006).

5. CONCLUSÕES

Com base nas análises fenotípicas foi possível confirmar que ano, sexo, tipo de pelagem, cor da pelagem e idade à contagem interferem no logaritmo da contagem de carrapatos +1.

A estratégia da varredura genômica com marcadores microssatélites se mostrou adequada para a detecção de QTL. Comprovou-se a grande variabilidade de marcadores microssatélites altamente polimórficos disponíveis para utilização em bovinos. Além disso, foi possível detectar um QTL para resistência a carrapato com efeito significativo no cromossomo 18 e um possível QTL no cromossomo 27. O mapeamento fino dessas regiões é necessário para o entendimento do efeito de cada QTL e a detecção de genes candidatos que poderão estar presentes nestas regiões.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; SONSTEGARD, T.S.; TASSELL, C.V. Detection of quantitative trait lociaffecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science** 87, 468-475, 2004.

BARENDSE, W.; ARMITAGE, S.M.; KOSSAREK, L.; KIRKPATRICK, B.W.; RYAN A.M.; SHALOM, A.; CLAYTON, D.; LI L.; NEIBERGS, H.; NAN Z.; GROSSE, M.; CREIGHTON, P.; McCARTHY, F.; RON M.; SOLLER, M.; FRIES, R.; McGRAW, R.A.; MOORE, S.S.; TEALE, A.; GEORGES, M.; WOMACK, J.E.; HETZEL, D.J.S. A preliminary map of the bovine genome. **Nature Genetics** 6, 227-235, 1994.

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

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Molecular markers in animal genetics improvement. **Biotechnology**. 5, 573-576, 1987.

BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; GROHS, C.; LEVEZIEL, H.; MALAFOSSE, A.; HOMSEN, H.; XU, N.; LOOFT, C.; KUHN, C.; BROCKMANN, G.A.; SCHWERINM.; WEIMANN, C.; HIENDLEDER, S.; ERHARDT, G.; MEDJUGORAC, I.; RUSS, I.; FORSTER, M.; BRENIG, B.; REINHARD,T F.; REENTS, R.; AVERDUNK, G.; BLUMEL, J.; BOICHARD, D.; KALM, E. Combined analysis of data from two granddaughter designs: A simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. **Genetics Selection Evolution** 35, 319–338, 2003.

BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; SUNDEN, S.L.F.; HAWKINS, G.A.; SOLINAS TOLDO, S.; FRIES, R.; GROSZ, M.D.; YOO, J.; BEATTIE, C.W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, 136, 619-625, 1994.

BLOTT, S., J. J.; KIM, S.; MOISIO, A.; SCHMIDT-KUNTZEL, A.; CORNET, P.; BERZI, N.; CAMBISANO, C.; FORD, B.; GRISART, D.; JOHNSON, L.; KARIM, P.; SIMON, R.; SNELL, R.; SPELMAN, J.; WONG, J.; VILKKI, M.; GEORGES, F.; FARNIR; COPPIETERS, W. Molecular dissection of a quantitative trait locus. A phenylalanine-

to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. **Genetics** 163, 253–266, 2003.

BOICHARD, D.; GROHS, C.; BOURGEOIS, F.; CERQUEIRA, F.; FAUGERAS, R.; NEAU, A.; RUPP, R.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M.Y.; LEVEZIEL, H. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. **Genetics Selection Evolution** 35, 77-101, 2003.

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

BOVENHUIS, H.; SCHROOTEN, C. Quantitative trait loci for milk production traits in dairy cattle. CD-ROM no. 09-07 in **Proceeding 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Montpellier, France. INRA, Toulouse, France, 2002.

BOWMAN, A. S.; NUTTAL, P. A. Ticks: biology, disease and control. **Parasitology**. 129, 1, 2004.

CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; FARMIR, F. The mh gene causing double muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. **Mammalian Genome**. 6, 788-792, 1995.

CHOWDHARY, B.P.; FRÖNICKE, L.; GUSTAVSSON , I.; SCHERTHAN, H. Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. **Mammalian Genome**. 7, 297-302, 1996.

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

CONNOR, E.E.,; ASHWELL, M.S.; SCHNABEL, R.; WILLIAMS, J.L. Comparative mapping of bovine chromosome 27 with human chromosome 8 near a dairy form QTL in cattle. **Cytogenet Genome Research** 112(1-2):98-102, 2006.

CORDOVÉS, C.O. Carrapato**:** controle ou erradicação. **2.ed. Porto Alegre, Agropecuária**,. 176p, 1997.

DAVIS, G.P.; DENISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **Journal Animal Science** 76, 2331-2339, 1998.

DE LA FUENTE, J.; RODRI´GUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCIA, G.J.C.; ME´NDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUE´, O.; FIVAZ, B.H.; DE WAAL, D.T.; LANDER, K. Indigenous and crossbred cattle, a comparison of resistance to ticks and implications for their strategic control in Zimbabwe. **Tropical Animal Health Production** 24:2, 81–89, 1992.

ELO, K. T.; J. VILKKI, D. J.; DE KONING, R. J.; VELMALA, A.; MAKI-TANILA, V. A quantitative trait locus for live weight maps to bovine Chromosome 23. . **Mammalian Genome** 10, 831–835, 1999.

FOIL, L.D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; SANCHEZ, H. F.; VAZQUEZ, Z. G.; GUERRERO, F.D.; JONSSON, N.N.; LANGSTAFF, I.G.; LI, A.Y.; MACHILA, N.; MILLER, R.J.,

MORTON, J.; PRUETT, J.H.; TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology** 125, 163-181, 2004.

FRIES, R.; RUVINSKY, A. The genetics of cattle. **Oxon: CABI**, 329-364, 1999

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology** 29, 57-71, 1999.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil**.. Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, 8, 49-61, 1993

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L.L. de; BALBI, M.V. 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, XV**. Campo Grande. 340, 1996.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**. 46, 319-330, 1975

GEORGES, M.; DIETZ, A.B., ISHRA, A. Microsatellite mapping to the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. **Proceeding National Academy of Science USA** 90, 1058-1062, 1993.

GONZALES, J.C. O controle dos carrapatos dos bovinos. Porto Alegre: **Sulina,** 104, 1975

GRISART, B.; W. COPPIETERS, F.; FARNIR, L.; KARIM, C.; FORD, P.; BERZI, N.; CAMBISANO, M.; MNI, S.; REID, P.; SIMON, R.; SPELMAN, M.; GEORGES, R.; SNELL. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research** 12, 222–231, 2002.

GUIMARÃES, S.E.F. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTL e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, J.C.C, 2 ed. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal.** FEP-MUZ Editora, Belo Horizonte, 1999

HALLERMAN, E.M.; NAVE, A.; SOLLER, M.; BECKMANN, J.S. Screening of Israeli Holstein-Friesian cattle for restriction fragment length polymorphisms using homologous and heterologous desoxyribonucleic acid probes**. Journal of Dairy Science** 71, 3378-3389, 1988.

HAMMOND, K. Small holder milk recording for developing countries. **29th Session. International Committee for animal recording**. Ottawa, Canada, 1994.

HAYES, H. Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. **Cytogenet Cell Genetic** 71:2,168-74, 1995.

HEYEN, D. W.; WELLER, J. I.; RON, M.; BAND, J. E.; BEEVER, E.; FELDMESSER, Y.; DA, G. R.; WIGGANS, P. M. VANRADEN, AND H. A. LEWIN. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **Physiology Genomics** 1, 165–175, 1999.

HEWETSON, R.W. Resistance of Cattle to Cattle Tick *Boophilus microplus*. II. The nheritance of Resistance to Experimental Infestation. **Australian Journal of Agricultural Research** 19, 495-505, 1968.

HONER, M.R.; GOMES, A. O manejo integrado de mosca dos chifres, berne e carrapatos em gado de corte. **Circular Técnica nº 22, Coop. Embrapa Gado de Corte**. 1990.

HORN, S.. Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: **World Veterinary Congress, Proceeding 23 Montreal**. 1987.

IHARA, N.; TAKASUGA, A.; KAZUNORI 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 Research** 14, 1987-1998, 2004.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**. 129, 3-14, 2004.

JONSSON, N.N. Control of cattle ticks (Boophilus microplus)on Queensland dairy farms. **Australian Veterinary Journal** 75:11, 802–807, 1997.

KAMIDI, R. E.; KAMIDI, M. K. Effects of a novel pesticide resistence management strategy on tick control in a Smallholding exotic-breed dairy herd in Kenya. **Tropical Animal Health and Production** 37, 469-478, 2005.

KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; MCGRAW, R.A.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; BEATTIE, C.W. A second-generation map of the bovine genome. **Genome Research** 7, 235-241, 1997.

KENNEDY, G.C.; GERMAN, N.S.; RUTTER, W.J. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. **Nature Genetics** 9, 293–298, 1995.

KLUNGLAND, H.; A. SABRY, B.; HERINGSTAD, H. G.; OLSEN, L.; GOMEZ-RAYA, D. I.; VAGE, I.; OLSAKER, J.; ODEGARD, G.; KLEMETSDAL, N.; SCHULMAN, J.; VILKKI, J.; RUANE, M.; AASLAND, K.; RONNINGEN, S. Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. **Mammalian Genome** 12, 837–842, 2001.

KUHN, C.J.; BENNEWITZ, N.; REINSCH, N.; XU, H.; THOMSEN, C.; LOOFT, G.A.; BROCKMANN, M.; SCHWERIN, C.; WEIMANN, S.; HIENDIEDER, G.; ERHARDT, I.; MEDJUGORAC, M.; FORSTER, B.; BRENIG, F.; REINHARDT, R.; REENTS, I.; RUSS, G.; AVERDUNK, J.; BLUMEL, E. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. **Journal of Dairy Science** 86, 360–368, 2003.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121, 185–199, 1989.

LEMOS, A.M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. **Documento EMBRAPA/CNPGL,** Coronel Pacheco, 6, 42 , 1986.

LEMOS, A.M.; TEODORO, R.L.; OLIVEIRA, G.P.; MADALENA, F.E. Comparative performance of six Holstein-FriesianxGuzera grades in Brazil. 3. Burdens of Boophilus microplus under field conditions**. Animal Production** 41, 187- 191, 1985.

LIU, B. Computational tools for study of complex traits. In: **Molecular Dissection of Complex Traits**, 1998.

MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L., Acelerando o melhoramento com o mapeamento do genoma bovino. **Informe Agropecuário** 22, 98-104, 2001

MADALENA, F. E.; TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; OLIVEIRA, G. P. Causes of Variation of Field Burdens of Cattle Ticks (*B. microplus*). **Revista Brasileira Genetica** 8:2, 61-375, 1985.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUUK, L.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology** 7, 639-655, 1998.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; FERREIRA, A.M. Biotecnologia na pecuária: genética molecular. **Informe Agropecuário** 21, 67-78, 2000.

MOSIG, M. O.; E. LIPKIN, G.; KHUTORESKAYA, M.; SOLLER, M.; FRIEDMAN, A. A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion. **Genetics** 157, 1683-1698, 2001.

NAGAR, S.K.; SAXENA, V.K.; RAOZADA. R.N. Studies on the rate of infestation of Boophilus microplus (acarina:Ixodidae) on Indian cattle:its activity and infestation differential. Ind. **Journal of Animal Science** 45:3, 173-173, 1978.

OBER, C.; TSALENKO, A.; PARRY, R.; COX, N.J. A secondgeneration genome wide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. **American Journal of Human Genetics** 67, 154–1162, 2000.

OLSEN, H. G.; GOMEZ-RAYA, D. I.; VÅGE, I.; OLSAKER, H.; KLUNGLAND, M.; SVENDSEN, T.; ÅDNØY, A.; SABRY, G.; KLEMETSDAL, N.; SCHULMAN, W.; KRÄMER, G.; THALLER, K.; RØNNINGEN; LIEN, S. A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production traits in Norwegian Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science** 85, 3124–3130, 2002.

O´KELLY, J.C.; SEIFERT, G.W. The efect of ticks (Boophilus microplus) infestations on the blood composition of Shorthorn x Hereford cattle on high and low planes of nutrition. **Australian Journal Biology Science** 23, 681, 1970.

PEELMAN, L.J.; MORTIAUX, F.; ZEVEREN, A..V.; DANSERCOER, A.; MOMMENS, G.; COOPMAN[1], F.; BOUQUET[1], Y.; BURNY, A.; RENAVILLE, R.; PORTETELLE, D. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four belgian cattle breeds**. Animal Genetics**, 29:3, 161-167, 1998.

PEGRAM, R.G.; TATCHELL, R.J.; CASTRO, J.J. Tick control: new concepts. **World Animal Review** 74, 75:2-11, 1993.

RENDEL, J. Breeding for Milk Products in the Tropics, In: **International DAIRY Congress**. 2, 452 , 1971.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. **Australian Journal of Agricultural Research** 8, 215–223, 1957.

RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; SOUTHEY, B.R.; HEYEN, D.W.; LEWIN, H.A. Interval and composite interval mapping of somatic cell score, yield, and components of milk in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 85, 3081–3091, 2002.

RON, M.; HEYEN, D.W.; WELLER, J.I.; BAND, M.; FELDMESSER, E.; PASTERNAK, H.; DA, Y.; WIGGANS, G.R.; VANRADEN, P.M.; EZRA, E.; LEWIN, H.A. Detection and analysis of a locus affecting milk concentration in the US and Israeli dairy cattle populations, in: **Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production,** Armidale, 26, 422–425, 1998.

SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSER, J. Test to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick Boophilus microplus. **Veterinary Parasitology** 95, 53–62**,** 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, vol 2, 142-147. 1986.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER,I. Biological control of ticks. **Parasitology** 129, 389-403, 2004.

SCHROOTEN, C.; BOVENHUIS, W.; COPPIETERS, J.A.M.; ARENDONK, V. Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 83, 795–806, 2000.

SCHULMAN, N. F.; MOISIO, S. M.; KONING, D.J.; ELO, K.; KI-TANILA, A.M.A.; VIKKI, J. QTL for health traits in Finnish ayrshire cattle. **Proc. 7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.** CD-ROM no. 09-19, 2002.

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

SEIFERT, G. B. Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of Zebu crossbred and British cattle in the field. **Australian Journal of Agricultural Research** 22, 839-850, 1970

SHAW, R. D. Tick control on domestic animals, a brief history of the economic significance of tick infestations. **Tropical Science** 11, 113–119, 1969.

SOLLER, M.; ANDERSSON, L. Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** 17, 329-345, 1998.

SOLLER, M.; GENIZI, A. The eficience of experimental designs for the detection of linkage between a marker locus affecting a quantitative trait in segregating populations. **Biometrics** 34, 47-55, 1978.

SONENSHINE, D.E.. Biology of ticks, **, Oxford University Press**, Vol. 1 New York, 1991.

SONSTEGARD, T.S.; TASSELL, C.P.V. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genetic Research, Camb**. 84, 3–9, 2004.

STEAR, M.J.; HETZEL, D.J. S.; BROWN, S.C.; GERSHWIN, L.J.;MACKINNON, M.J.; NICHOLAS, F. W. The relationships among ecto - and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. **Veterinary Parasitology** 34, 303-321, 1990.

TASSEL, C.V.; SONSTERGARD, T.S.; ASHWELL. M.S. Aplication of genomics to dairy cattle breeding. **Anais do VI Congresso Holstein de Las Americas** 155-167, 2001.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MADALENA, F.E. Effects of ticks *Boophilus microplus* infestations on milk yield of *Bos taurus/Bos indicus* crosses. **In Proceeding of the 6th World Congress Genetics Applied to Livestock Production** 27, 137-180, 1998.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MOREIRA, D.P.; MADALENA, F.E. Resistência Genética dos Bovinos ao Carrapato (*Boophilus microplus*). VII. Resistência de Touros Mestiços sob Infestação Artificial. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Belo Horizonte** 54, 1984.

TEODORO. R.L.; PIRES, M.F.A.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; CÉLIO FREITAS, C.; JUNQUEIRA, M.M.; VERNEQUE, R.S.; PEIXOTO, M.G.C.D.; MARTINEZ, M.L. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para a resistência a carrapatos e bernes em uma população experimental F2 Holandês X Gir. **Proceeding of the 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia,** 2006.

THIESEN, W.L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: **SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOSE DOS BOVINOS** 207-215, 1979

UTECH, K. B. W. Prospects of Selection for Tick Resistance in British Breeds of Cattle. The Future of the British Breeds in Tick Areas. s. 1., **Queensland Agricultural College** 30-38, 1979.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H. Breeding fo Resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman x Australian Illawarra Shorthorn Cattle. **Australian Veterinary Journal** 58, 41-46, 1982

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, J.D. Resistance to Boophilus microplus (Canestreni) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research** 29, 885–895, 1978.

VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI' K.; EGGEN, A.; CIAMPOLINI, R.; LÉPINGLE, A.; VELMALA, R.; KAUKINEN, J.; VARVIO, S. L.; MARTIN, P.; LEVÉZIEL, H.; GUÉRIN, G. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. **Mammalian Genome** 5, 288 – 297, 1994

VERISSIMO, C. J.; NICOLAU. C.V.J.; CARDOSO, V. L.; PINHEIRO, M.G. Características do pelame e infestação por carrapatos em bovinos GirGyr e mestiços (Holandês x

GirGyr). **Proceeding of the 33th Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** 1, 379-380, 1996.

VERÍSSIMO, C.J.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, A.A.D.; RIBEIRO, W.R.; ROCHA, U.F. Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus.* **Boletim da Industria Animal** 54, 1-10, 1997.

VILLARES, J.B. Climatologia zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim da Industria Animal** 4:1, 60-86, 1941.

WAMBURA, P.N.; GWAKISA, P.S.; SILAYO, R.S.,; RUGAIMUKAMU, E.A. Breed associated resistance to tick infestation in Bos indicus and their crosses with Bos taurus. **Veterinary Parasitology** 77, 63–70, 1998.

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. **J. Aust. Entomol**. **Soc.,** 9, 171-182, 1970.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against Boophilus microplus. **Parasitology** 110, 43–50, 1995.

YOUNG, A.S.; MORZARIA, S. P. Biology of babesia. **Parasitology** 2, 211-219, 1986.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo