

ANA LUISA SOUSA AZEVEDO

DETECÇÃO DE QTL PARA RESISTÊNCIA AO CARRAPATO *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* POR MEIO DE VARREDURA GENÔMICA EM BOVINOS

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

VIÇOSA  
BRASIL - MINAS GERAIS  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA LUISA SOUSA AZEVEDO

DETECÇÃO DE QTL PARA RESISTÊNCIA AO CARRAPATO *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* POR MEIO DE VARREDURA GENÔMICA EM BOVINOS

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

APROVADA: 10 de outubro de 2008

---

Marco Antonio Machado  
(Co-orientador)

---

Roberto Luiz Teodoro

---

Paulo Luiz Souza Carneiro

---

Maria Gabriela C. Diniz Peixoto

---

Simone Eliza Facioni Guimarães  
(Orientadora)

Aos meus pais Dirceu e Terezinha e  
aos meus irmãos Juliana e Artur, pelo grande incentivo,  
A Marco Antonio, pelo grande apoio pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Dr. Mario Luiz Martinez (*in memoriam*), 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 e pela excelente convivência no laboratório.

Ao Dr. Jonh Furlong e ao Dr. Roberto Teodoro pela coordenação das avaliações realizadas no Campo Experimental de Santa Mônica.

Ao Dr. Rui Verneque e à Dra. Maria Gabriela Peixoto pela grande contribuição nas análises estatísticas.

Aos colegas de laboratório em geral pela convivência e em especial a Vanessa Belo, Robert Domingues e Karla Gasparini pela ajuda nas genotipagens.

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.

Em outubro de 2006 iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese no dia 10 de outubro de 2008.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Variabilidade existente entre <i>B. p. taurus</i> e <i>B. p. indicus</i> para características relacionadas à adaptação aos trópicos.....	4
2.2. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	7
2.3. Controle do carrapato bovino .....	10
2.4. Marcadores moleculares .....	12
2.5. Mapeamento de QTL.....	15
2.6. Seleção assistida por marcadores .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Delineamento experimental .....	22
3.2. Avaliação do número de carrapatos por animal .....	23

3.3. Extração de DNA .....	24
3.4. Varredura genômica com marcadores moleculares.....	25
3.5. Análises estatísticas.....	28
3.6. Construção dos mapas de ligação .....	31
3.7. Análises para detecção de QTL .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1. Mapas de Ligação .....	34
4.2. <i>Scoring</i> dos marcadores microssatélites .....	38
4.3. Diversidade dos marcadores moleculares .....	43
4.4. Análise para a resistência ao carrapato na população F2 .....	44
4.5. Mapeamento de QTL .....	50
5. CONCLUSÕES .....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## RESUMO

AZEVEDO, Ana Luisa Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Detecção de QTL para resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por meio de varredura genômica 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. Já está bem caracterizada a diferença existente com relação à resistência a carrapatos entre as duas subespécies bovinas, *B.p. taurus* e *B.p. indicus*. A variação genética entre *B.p.taurus* e *B.p.indicus*, para a resistência a carrapatos, juntamente com o avanço nas técnicas moleculares 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. (B.) microplus* em uma população F2 de bovinos oriunda do cruzamento entre touros da raça Holandesa e vacas de raça Gir. Foram realizadas infestações artificiais com carrapato bovino para determinação do nível de resistência de cada animal F2. As avaliações foram realizadas em duas estações, na seca e na chuvosa. Foram selecionados 109 marcadores microssatélites, a partir do mapa do MARC/USDA, visando cobrir os cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22, 25 e 28, com um espaçamento médio de 20 cM entre

os marcadores. Os estudos de associação indicaram a presença de QTL significativos em quatro cromossomos. Para a maioria dos QTL detectados foi encontrada uma diferença no padrão de resposta de acordo com a estação. No BTA2 foi identificado um QTL ( $P_c < 0,01$ ) na região central do cromossomo com efeito dominante, na estação seca. No BTA6 foram detectados três QTL ( $P_c < 0,05$ ). O QTL localizado na extremidade centromérica apresentou o mesmo padrão em ambas as estações. O QTL localizado na posição de 40 cM foi detectado apenas na estação seca e o QTL localizado na posição de 100 cM foi detectado apenas na estação chuvosa. Todos os QTL identificados no BTA6 apresentaram efeito aditivo, sendo a resistência ao carrapato herdada da raça Gir. No BTA10 foram identificados dois QTL ( $P_c < 0,01$ ) na estação chuvosa ambos com efeito aditivo. O QTL identificado com o maior valor de F (16,5) foi detectado na posição 43 cM no BTA11, em que foi possível identificar um QTL com efeito aditivo altamente significativo ( $P_c < 0,01$ ), na estação seca. Esse QTL é responsável por 5,02% da variação fenotípica da característica. As regiões em que foram detectados QTL mais significativamente associados devem ser saturadas com marcadores adicionais e também validados em populações comerciais.

## ABSTRACT

AZEVEDO, Ana Luisa Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2008. **Detection of resistance QTL to tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through a genome scan on bovine.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães, Co-Advisers: Paulo Sávio Lopes and Marco Antonio Machado.

In tropical countries losses caused by bovine tick infestation have a tremendous economic impact on production systems. The different levels of tick resistance between *B. p. taurus* e *B. p. indicus* is well documented. Genetic variation between *Bos p. taurus* and *Bos p. 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 R. (B.) microplus resistance/susceptibility in a bovine F2 population derived from the Gyr (*B. p. indicus*) x Holstein (*B. p. taurus*) cross. Artificial infestations with tick were conducted to determine the level of resistance of each F2 animal. Evaluations were performed in two seasons, dry and wet. A total of 109 microsatellite markers were selected from MARC/USDA map to cover chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22, 25 e 28 in 20 cM intervals. Association studies indicated the presence of significant QTL in four chromosomes. In each season distinct response patterns were found for most detected QTL. A dominant QTL ( $P_c$

<0.01) was found in the central region of BTA2 for the dry season. Three QTL were detected on BTA6 ( $P_c < 0.05$ ). The one located in the beginning of the chromosome showed the same pattern in both dry and wet seasons. The QTL located close to 40 cM was detected only in wet season and the QTL located close to 100 cM was detected only in dry season. All QTL detected on BTA6 showed additive effect with the tick resistance derived from Gir breed. Two additive QTL were detected ( $P_c < 0.01$ ) on BTA10 for wet season. The highest significant F value (16.5) was detected at 43 cM position on BTA 11 showing a highly significant QTL with additive effect ( $P_c < 0.01$ ) for dry season. This QTL alone is responsible for 5,02% of the trait phenotypic variance. Highly significant detected QTL should be saturated with additional markers and also validated in commercial herds.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um dos maiores rebanhos comercial do mundo, com mais de 169 milhões de cabeças de gado (IBGE, Censo Agropecuário 2006). Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization), o Brasil é o sexto colocado na classificação mundial de produção de leite, sendo responsável por 4,6% da produção mundial de leite bovino, o que equivale a uma produção de mais de 25 bilhões de toneladas de leite por ano. Entretanto, quando foi avaliada a produtividade de cada país, o Brasil caiu para a 21ª colocação, apresentando uma produtividade de 1.236 Kg/vaca/ano. Essa baixa produtividade está, dentre outras, relacionada com as características climáticas do país, pois as raças que apresentam maior produtividade não são adaptadas ao clima tropical e às adversidades encontradas normalmente nesses ambientes. Um dos principais problemas nos países de clima tropical é a presença de carrapatos, pois as infestações por estes parasitas têm provocado, além da redução na produtividade, até mesmo a morte dos animais mais suscetíveis.

Em termos econômicos, essas perdas causadas pelos ectoparasitas acarretam reduções drásticas na produção de carne e leite. O país deixa de produzir 28 milhões de arrobas de carne/ano e 4,3 bilhões de litros de leite/ano causando um prejuízo da ordem de R\$ 2,24 bilhões (Martinez *et al.*, 2006).

Além disso, as infestações por carrapatos e bernes contribuem 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 dados da FAO, as infestações de carrapatos são responsáveis por um prejuízo em torno de sete bilhões de dólares por ano no mundo todo.

A crescente competitividade do processo de produção no país vem tornando a eficiência econômica cada vez mais importante para os criadores. Todo e qualquer fator que interfira com o processo produtivo, seja este oriundo de manejo, reprodução, nutrição, genética, entre outros deve ser conhecido e explorado. Assim, existe um grande interesse do mercado nas tecnologias que proporcionem melhorias no rendimento econômico de cada sistema de produção existente. Dessa forma, o melhoramento animal surge como uma das principais ferramentas para auxiliar no aumento da produtividade. O melhoramento animal pode ser dividido em duas categorias, o melhoramento clássico, que se baseia diretamente na observação do fenótipo do indivíduo e o melhoramento assistido por marcadores, que utiliza a informação fornecida por marcadores moleculares específicos para selecionar indivíduos com genótipos favoráveis.

A seleção assistida por marcadores é muito útil, pois, existem características expressas em apenas um sexo (produção de leite) ou características de difícil mensuração (eficiência alimentar, resistência a doenças). Em muitas situações, o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo. Isto ocorre porque 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). Dessa forma, a seleção clássica, baseada apenas no fenótipo torna-se um pouco complicada,

então, a utilização de marcadores moleculares pode auxiliar muito na seleção de características quantitativas.

A grande maioria das características de crescimento, produção e resistência a doenças são consideradas quantitativas, dessa forma, são controladas por vários genes e são influenciadas pelo ambiente. Já foi comprovado que a resistência a carrapatos é controlada por vários genes e que a seleção dos mesmos pode trazer grandes avanços para a pecuária dos países de clima tropical (Frish *et al.*, 2000). 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.

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. Segundo Jongejan *et al.* (2007), a genômica pode auxiliar o entendimento da relação carrapato-hospedeiro de três maneiras: 1- por meio da geração de novos recursos, como informações do genoma e técnicas experimentais; 2- por meio da aplicação desses novos recursos juntamente com as técnicas tradicionais de pesquisas biológicas e 3- por meio do desenvolvimento de novas práticas de intervenções entre o carrapato e o hospedeiro.

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

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Variabilidade existente entre *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus* para características relacionadas à adaptação aos trópicos

Conforme a nomenclatura clássica proposta por Linnaeus (1758) os bovinos se dividem em duas espécies do gênero *Bos* (*Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*). Porém, dada a inexistência de um isolamento geográfico e à possibilidade de cruzamento produzindo descendentes férteis, estas são atualmente classificadas como subespécies. Estudos realizados utilizando mtDNA mostram que o processo de domesticação bovina, que se iniciou cerca de 11.000 anos atrás, ocorreu em no mínimo dois pontos independentes, a partir de subespécies de *Bos primigenius*, o que pode explicar a grande diversidade genética encontrada entre animais taurinos e zebuínos (Edwards *et al.*, 2004; Loftus *et al.*, 1994). A Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) estabeleceu, em 2003, que a denominação mais apropriada seria *Bos primigenius indicus* e *Bos primigenius taurus* caso essas estejam sendo consideradas como subespécies, do contrário, a nomenclatura proposta por Linnaeus continua correta.

A subespécie *Bos primigenius indicus* é composta por animais indianos também denominados animais zebuínos ou gado Zebu. Esses animais apresentam as seguintes características: alta capacidade de tolerância ao calor tropical, maior resistência a parasitas, capacidade de aproveitar pastagens grosseiras, pastam mais tempo sob o sol, maior período de gestação (média de 291,5 dias), apresentam pelos curtos e lisos que favorecem a eliminação de calor, membros longos e com menor cobertura muscular, desenvolvimento mais lento que as raças taurinas.

Já a subespécie *Bos primigenius taurus* pode ser denominada de taurinos ou gado europeu e possuem características praticamente opostas às do gado zebuíno. São animais com baixa capacidade de tolerância ao calor, apresentando alterações no ritmo respiratório e na temperatura corporal quando expostos ao calor intenso, baixa resistência à parasitas, são animais mais exigentes quanto às pastagens e ao seu valor nutritivo, menor período de gestação (280 dias), pele geralmente espessa e coberta com longos pelos, o que dificulta a dissipação de calor, membros curtos e com boa cobertura muscular, crescimento rápido.

Dentre as adaptações genéticas sofridas pelo gado zebuíno durante seu processo evolutivo, uma das mais importantes foi a seleção de genes responsáveis pela maior termo-tolerância desses animais. Os animais zebuínos são capazes de alterar a temperatura corporal em resposta ao estresse calórico muito mais rápido que animais taurinos (Hammond *et al.*, 1996; Gaughan *et al.*, 1999). Devido a essa maior tolerância ao estresse térmico, os animais zebuínos sofrem menos quando submetidos ao estresse calórico, conseqüentemente a produção de leite e carne não é tão afetada como ocorre com os animais taurinos. Como resposta ao estresse calórico ocorre reduções no consumo alimentar, taxa de crescimento, produção de leite e reprodução, sendo que esses efeitos são maiores nos animais taurinos.

Já está bem caracterizada a diferença existente com relação à resistência a carrapatos entre zebuínos e taurinos. A resistência à infestação corresponde à capacidade que um animal apresenta de limitar o número de

larvas que se desenvolvem sobre o mesmo evitando com que as larvas concluam o seu ciclo sobre animal. Esta habilidade depende de fatores fisiológicos, comportamentais, imunológicos e anatômicos, que caracterizam as raças e também de fatores ambientais. As raças européias são muito mais susceptíveis às infestações desse parasita. A maior resistência dos animais zebuínos é atribuída a muitos fatores adaptativos e a centenas de anos de seleção natural pelos quais esses animais já passaram ao longo da evolução. Animais zebuínos puros são considerados 99% resistentes enquanto que os taurinos apresentam uma resistência entre 85 e 90% (Utech *et al.*, 1978). Há diferentes explicações para a diferença da resistência ao carrapato entre taurinos e zebuínos. Segundo Gonzales (1975), uma explicação para a resistência dos zebuínos é que os mesmos possuem mais glândulas sebáceas na pele, produzindo odores que afastariam o carrapato, assim como maior mobilidade geral do animal e de sua pele, o que possivelmente faz com que se defenda melhor da infestação. Veríssimo (1991) explicou que o sistema de alimentação da larva de *R. (B.) microplus* depende de uma reação inflamatória que se inicia no momento da fixação da larva. Os zebuínos apresentam uma reação inflamatória mais intensa que o gado europeu levando-o a realizar uma auto-limpeza mais eficiente, o que contribuiria para um equilíbrio carrapato/hospedeiro, sendo que nestes animais, a infestação é mínima. O gado zebu já convive há milhares de anos com o *R. (B.) microplus*, dessa forma, esses animais já sofreram um processo de seleção natural, em que os animais mais susceptíveis foram eliminados permitindo então maiores oportunidades para os animais geneticamente mais resistentes (Teodoro *et al.*, 2004). Segundo Johnson (2006) animais zebuínos normalmente apresenta um décimo do número de carrapatos comparados com animais taurinos quando expostos a infestações semelhantes.

Embora a resistência ao carrapato seja bastante variável entre as diferentes raças, não existe uma que seja totalmente resistente. Dessa forma, quando as condições são favoráveis a esses parasitas, ocorre uma diminuição

do desempenho do animal, sendo que essa diminuição esta diretamente ligada ao número de fêmeas ingurgitadas de carrapatos (Scholtz *et al.*, 1991).

## **2.2. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

A espécie *R. (B.) microplus* originou-se provavelmente na Ásia e adaptou-se perfeitamente ao clima das demais regiões tropicais, em que o calor e a umidade proporcionam condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (Powel & Reid, 1982).

Os carrapatos 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), aproximadamente 80% da fauna de carrapatos pertence aos Ixodideos (683 espécies). O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) pertence ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Ordem Ixodida, Família Ixodidae, Gênero *Rhipicephalus*. O carrapato bovino, conhecido anteriormente apenas como *Boophilus microplus* foi reclassificado em 2003 após novos estudos morfológicos e moleculares que identificaram espécies dentro do gênero *Rhipicephalus* que eram mais semelhantes às espécies do gênero *Boophilus* do que a outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Essa descoberta tornou o gênero *Rhipicephalus* parafilético e Murrel & Barker (2003) sugeriram a inclusão das espécies de *Boophilus* dentro do gênero *Rhipicephalus*, porém, para preservar o nome *Boophilus* permaneceu como subgênero.

*R. (B.) microplus* é a única espécie do subgênero identificada no Brasil sendo que o mesmo é o ectoparasita que mais causa danos aos rebanhos de bovinos no país. Segundo Bowman (2004), estima-se que 80% do rebanho bovino mundial esteja infestado por carrapatos. Como resultado, o carrapato é o ectoparasita mais importante para a produção animal mundial, do ponto de vista econômico. *R. (B.) microplus* tem ampla distribuição mundial, principalmente

nas regiões tropicais e subtropicais, estando presente na faixa entre os paralelos 32° N e 32° S. No Brasil, esse carrapato foi introduzido com o gado trazido pelos primeiros colonizadores e atualmente encontra-se distribuído em quase todos os estados. 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. (B.) microplus*. No Brasil, Martinez *et al.* (2006) estimaram as perdas econômicas em mais de 800 milhões de dólares ao ano no Brasil, quando contabilizadas a queda na produção de leite e carne, a mortalidade, a redução na natalidade, os gastos no seu controle e a transmissão de doenças.

*R. (B.) microplus* é um ectoparasita que utiliza apenas um hospedeiro, que na maioria das vezes são os bovinos, podendo excepcionalmente parasitar outros animais. Seu desenvolvimento se divide em duas fases, a fase parasitária que ocorre sobre os bovinos e a fase de vida livre onde o carrapato completa o seu ciclo no solo.

A fase parasitária começa com a subida da larva infestante no hospedeiro sendo que após a fixação são denominadas “larvas parasitárias”. Estas procuram uma área no animal para fixação, normalmente em locais abrigados das defesas mecânicas do hospedeiro, tais como, base da cauda, barbela, peito e parte posterior das coxas. Junto ao local de fixação aparecem zonas de hiperemia e inflamação. A larva após a troca de cutícula (metalarva) dá origem à ninfa, por volta de 8 a 10 dias. Esta se alimenta de sangue, sofre uma muda (metaninfa), ao redor do 15º dia e transforma-se em adulto imaturo, neandro (macho) e neógina (fêmea). A fêmea, após o acasalamento, começa a se alimentar de sangue até o ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo. Os machos permanecem no animal por um período mais longo, acasalando-se com várias fêmeas. A fase parasitária dura aproximadamente 21 dias, na qual o carrapato passa por todos os estágios, alimentando-se de linfa, estratos teciduais e plasma.

A fase de vida livre inicia-se com a queda das fêmeas ingurgitadas “teleóginas” e culmina quando as larvas eclodidas encontram o hospedeiro. A teleógina ao desprender-se do animal parasitado, cai no solo em geral na primeira metade da manhã, procurando locais abrigados de incidência direta de luz solar para sua ovoposição. O período compreendido entre a queda e o início da postura é chamado de pré-postura. Em condições ideais de temperatura (em torno de 27°C) a pré-postura leva cerca de três dias, podendo se estender a mais de 90 dias. Em temperaturas entre 27°C e 28°C e com alta umidade (aproximadamente 80%), a postura e a eclosão ocorrem aproximadamente em 18 dias, podendo, no entanto durar até mais de 100 dias. A fêmea morre logo após a postura. Normalmente uma teleógina coloca cerca de 3000 a 4000 ovos. Em condições climáticas favoráveis, uma semana depois da ovoposição inicia-se a eclosão das larvas que, dependendo da época do ano pode levar de 6 semanas até 6 meses. As larvas recém eclodidas migram para as folhas mais altas, onde podem localizar o hospedeiro pelo odor ou vibrações (Olsen, 1974). Nesta fase, elas se tornam “larvas infestantes”. Após 3 a 5 dias da eclosão, elas se tornam amarelo-avermelhadas, medindo cerca de 0,7 por 0,5 mm. As larvas nas pastagens apresentam geotropismo negativo e fototropismo positivo à intensidade moderada de luz. Sua longevidade depende da temperatura e da umidade relativa, sendo que o calor acelera o metabolismo. À medida que aumenta sua idade fisiológica, elas vão perdendo sua capacidade infestante. Na vegetação, as larvas ficam agrupadas, evitando desse modo a perda de umidade e protegendo-se da incidência direta dos raios solares, aguardando a passagem do hospedeiro. Podem permanecer nestes locais, por mais de 8 meses, até que um animal adequado seja encontrado. O período de atividade das larvas na vegetação, ocorre nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, quando a temperatura é mais amena. O tempo de vida livre do carrapato gira em torno de 28 a 51 dias, podendo se estender a mais de 300 dias. Segundo Gonzáles (1975) em condições ótimas de temperatura e umidade, a queda/ postura/ eclosão ocorrem em aproximadamente um mês. A fase de vida livre sofre grande influencia climática, trazendo significativas alterações no seu

tempo de duração sendo que a temperatura e a umidade relativa do ar são os principais fatores que interferem nessa etapa. Já a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões.

Durante a fase parasitária, o carrapato causa perda de sangue, devido à sua ação hematófaga, influenciando no ganho de peso, no estado nutricional e, em conseqüência, na produção, dependendo da intensidade da infestação parasitária. 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). A lesão causada na pele dos animais pode favorecer o aparecimento de infecções secundárias como as miíases cutâneas. Além de danificar o couro do hospedeiro, o que prejudica sua comercialização, os carrapatos sugam grande volume de sangue após sua fixação podendo causar anemia no hospedeiro e até levá-lo à morte (Frisch *et al.*, 2000)

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. (B.) microplus* ingere entre 0,5 a 3 ml de sangue durante a vida parasitária (Seifert, 1970; Gonzales, 1975). O *R. (B.) 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).

### **2.3. Controle do carrapato bovino**

Existem diversas formas de controle do carrapato, entre elas a utilização de produtos químicos, o consórcio de pastagens, a utilização de vacinas e a seleção de animais resistentes. Porém, a maioria dessas formas de controle

não são muito eficientes, contribuindo apenas com uma redução no número de parasitas. O controle químico, por exemplo, não é uma alternativa muito eficaz para controle do carrapato, uma vez que o uso indiscriminado destes produtos faz com que surjam cepas resistentes a todas as classes de compostos químicos comercialmente utilizados. Dessa maneira, novos compostos devem ser desenvolvidos formando então um ciclo vicioso. Além disso, a utilização de compostos químicos apresenta um alto custo, tanto na aquisição do produto e equipamentos como na disponibilização de mão de obra. Os acaricidas são soluções de curto prazo para um problema imediato, e não resolvem o problema do controle de carrapatos a longo prazo. O consórcio e rotação de pastagens específicas (capim gordura, capim elefante, andropogon), implantação de lavouras por um período na área infestada e vacinas apresentam-se como alternativas eficazes somente em casos de baixa infestação de carrapatos. Outro método para o combate do 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. Desta forma, a seleção de animais resistentes ao carrapato apresenta-se como alternativa que atualmente mais preenche os requisitos necessários para amenizar este problema em qualquer sistema de produção de bovinos de leite e de corte.

A seleção de hospedeiros resistentes é uma das soluções 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).

A principal forma de controle ainda são os banhos carrapaticidas, porém o crescente surgimento de populações de carrapato resistentes aos acaricidas disponíveis no mercado e o aparecimento de resíduos químicos em alimentos de origem animal demanda o desenvolvimento de abordagens alternativas de controle, como o uso de vacinas ou a seleção de animais resistentes.

## **2.4. Marcadores moleculares**

Marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Existem diversos tipos de marcadores moleculares, com características distintas e com aplicações variadas.

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica por meio do estudo de populações segregantes. Portanto, só ocasionalmente é que marcadores morfológicos ligados a genes de importância econômica eram identificados, limitando seu emprego em programas de melhoramento.

A revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. O número de marcadores genéticos foi ampliado e

a aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todas as espécies. Com o advento das técnicas modernas da biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de comprimento de fragmentos de restrição de DNA, técnica esta denominada RFLP (Grodzicker et al., 1974). Posteriormente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) (Mullis & Faloona, 1987) levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento de DNA, estas metodologias têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas eucariotos. Hoje, um número ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo.

Os marcadores moleculares mais empregados atualmente para a identificação de regiões genômicas associadas a características de interesse econômico são os marcadores microssatélites. Estes pertencem a uma classe de DNA repetitivo contida no genoma dos eucariotos. São seqüências de DNA que contém unidades que se repetem em tandem variando de 1 a 6 pb (Tautz, 1989). Cada repetição em tandem constitui um loco de microssatélite cujos alelos se diferenciam por variações no tamanho total do microssatélite. São marcadores co-dominantes, multialélicos, altamente polimórficos e de distribuição ampla no genoma, sendo então amplamente utilizados como marcadores em estudos de genética de populações e mapeamento. São conhecidos também como polimorfismos VNTR (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*, número variável de repetições em tandem) ou STR (do inglês *Short Tandem Repeats*, repetições pequenas em tandem). São os marcadores moleculares mais empregados em estudos de QTL, pois são fáceis de se estudar por PCR e existem em vários organismos de interesse para melhoramento genético. Apesar de serem fáceis de analisar, o procedimento para conseguir uma série de marcadores microssatélites para uma espécie em que isso não tenha sido feito é muito trabalhoso.

Considerando a estimativa de que nos genomas das espécies de animais domésticos podem estar disponíveis de 50.000 a 150.000 regiões microssatélites (Hillel *et al.*, 1992), a facilidade em obter a genotipagem de animais por meio da PCR e também o elevado conteúdo de informação polimórfica (PIC), permite que qualquer população segregante possa ser alvo de estudo de ligação ou de mapeamento genético empregando microssatélites. Os microssatélites mais estudados são as repetições  $(CA)_n / (GT)_n$  pois estes estão presentes com maior frequência na maioria dos genomas de eucariotos. Em humanos, estas repetições estão presentes a cada 100 kb e existem aproximadamente 35000 seqüências deste tipo no genoma haplóide (Weber, 1990). Wintero *et al.* (1992) estimaram a existência de 65000 a 100000 microssatélites  $(CA)_n / (GT)_n$  em todo o genoma suíno sendo que estas repetições estão mais ou menos distribuídas uniformemente ao longo de todos os cromossomos sendo que apresentam menor representação nas regiões centroméricas e em regiões que contém outras categorias de DNA repetitivo.

Os marcadores microssatélites são amplamente utilizados como marcadores genéticos graças ao seu grande polimorfismo e a distribuição diferenciada de frequências alélicas em diferentes raças e populações. Atualmente são utilizados em análises forenses, testes de paternidade, trabalhos de biodiversidade, análises filogenéticas, construção de mapas genéticos ou simplesmente como marcadores para a detecção de QTL de importância econômica para a produção animal.

Outro tipo de marcador molecular amplamente utilizado são os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Os polimorfismos de nucleotídeos simples são alterações de ponto encontradas ao longo da molécula de DNA e correspondem a posições em que existe uma alternância dos nucleotídeos A, C, G ou T, em uma frequência alélica mínima de 1% em uma dada população (Brookes, 1999). Em princípio, os SNPs podem ser considerados polimorfismos bi, tri ou tetra-alélicos, porém, é tão raro encontrar SNPs tri ou tetra-alélicos que normalmente são considerados como bi-alélicos. Esses SNPs podem estar presentes em qualquer região do DNA, ou seja, podem estar dentro de exons

ou mesmo em regiões não codificantes. A alteração mais comum nos SNPs é a transição, em que ocorre a troca de bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, ocorrem trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C). As alterações só são consideradas SNPs quando ocorrem nas células germinativas, passando então para as gerações futuras fixando na população em uma frequência mínima de 1%. São amplamente empregados nos estudos moleculares devido à alta frequência no genoma. Os SNPs ocorrem, aproximadamente, a cada 1000 pares de bases. Essa alta frequência no genoma compensa o baixo conteúdo informativo dos mesmos, já que estes marcadores são bi-alélicos. Graças ao desenvolvimento tecnológico de software e de equipamentos cada vez mais robustos e sofisticados, vem sendo possível gerar e analisar um grande número de SNPs utilizando plataformas totalmente automatizadas e que permitem a genotipagem de milhares de SNPs em um único chip. Esses marcadores estão sendo largamente utilizados para seleção do genoma inteiro (whole genome selection) e também no mapeamento fino para a saturação de regiões em que foram detectados QTL, visto que são muito mais frequentes no genoma do que os marcadores microssatélites.

## **2.5. Mapeamento de QTL**

Segundo Lynch & Walsh (1998), a idéia central sobre a utilização de marcadores moleculares para a detecção de QTL é muito simples: por meio do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas é possível criar o desequilíbrio de ligação entre os locos que diferem entre as linhagens parentais, criando então a associação entre os locos marcadores e o QTL segregante.

O desequilíbrio de ligação pode ser definido como uma associação não ao acaso entre diferentes locos. A detecção de ligação genética entre marcadores e QTL depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos do loco marcador e do QTL. Sem esse pré-requisito, os alelos dos locos marcadores e dos QTL ocorrerão em combinações equivalentes à distribuição

independente, fazendo com que os QTL não sejam detectados. O desequilíbrio de ligação é amplamente usado nas análises de varredura genômica em animais domésticos, em que o objetivo final é encontrar marcadores moleculares associados às características fenotípicas de interesse. Este desequilíbrio cria associação entre o loco marcador e o QTL segregante. Para que um programa de análise de QTL tenha sucesso é preciso que os marcadores moleculares estejam em desequilíbrio de ligação com os alelos segregantes nos locos que influenciam as características fenotípicas. Vários delineamentos experimentais e metodologias estatísticas têm sido desenvolvidos para explorar este desequilíbrio como, por exemplo, populações  $F_2$  (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998).

Os QTL são identificados em experimentos de mapeamento que envolve três fontes de variação: estrutura de pedigree, informação de marcadores moleculares e informações fenotípicas. Os métodos de análise visam responder questões básicas como o modo de ação de um QTL e a magnitude de seu efeito, facilitando assim a manipulação dessas informações para propósitos de melhoramento. A presença de um QTL é detectada por meio de estudos de mapeamento que mostram diferenças fenotípicas significativas entre indivíduos que recebem diferentes alelos do QTL em questão. A lógica inicial do mapeamento de QTL é simples, em uma população de mapeamento originada do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas, em que os alelos estão fixados alternativamente, os animais são fenotipados e genotipados. Testes para determinar a presença de diferenças significativas entre os fenótipos e os marcadores são acompanhados da aplicação de métodos estatísticos. Se uma diferença significativa é encontrada, existe então uma ligação entre o marcador e um QTL (Lynch & Walsh, 1998).

Uma vez que o mapeamento baseia-se na ocorrência do desequilíbrio, são usados normalmente delineamentos que maximizam esse desequilíbrio. Se os genitores usados em tais cruzamentos forem fenotipicamente contrastantes para caracteres quantitativos de interesse, é provável que essas variações também existam nos locos que afetam esses caracteres (Kearsey, 1998).

Assim, cruzamentos controlados envolvendo genitores contrastantes, maximizam o desequilíbrio de ligação entre os QTL e os marcadores das populações de mapeamento, aumentando a probabilidade de detectá-los.

Dentre todos os delineamentos endogâmicos, o mais utilizado é o delineamento F2, que consiste em examinar a associação entre marcador-característica dentro da progênie originada do cruzamento entre os indivíduos F1 que foram formados a partir do cruzamento entre duas linhagens distintas. O cruzamento entre duas linhagens distintas provoca o desequilíbrio de ligação entre os locos, sendo que o mesmo é a base para a detecção de QTL, criando então associações entre os marcadores e os QTL ligados que estão segregando. Neste tipo de população os três genótipos (dominante, heterozigoto e recessivo) podem ser identificados o que permite estimar os efeitos de dominância e aditividade e a recombinação em qualquer um dos marcadores afetará o valor esperado da característica (Lynch & Walsh, 1998).

O delineamento F2 em animais domésticos apresenta algumas peculiaridades, já que ao contrário do que ocorre com muitas espécies de plantas, não existe autofecundação, acarretando então uma maior variabilidade genética dentro das linhagens. O conceito inicial de população F2 parte do princípio de que o acasalamento inicial é realizado entre linhagens distintas, endogâmicas, em que todos os marcadores e QTL foram fixados alternativamente dentro de cada linhagem. Porém, no delineamento F2 em animais domésticos é quase que impossível conseguir linhagens totalmente distintas. Devido ao grande intervalo de geração e ao elevado custo para manter uma população de animais domésticos, é totalmente inviável a formação de populações endogâmicas para dar início a uma população F2. O que ocorre normalmente é o cruzamento entre duas raças ou linhagens que diferem muito com relação à característica que será avaliada, ou seja, parte do princípio que essas raças apresentam os QTL fixados alternativamente dentro de cada uma, porém, os marcadores moleculares podem estar segregando em ambas. Normalmente, as raças que serão selecionadas para formar a população parental sofreram processos distintos de seleção, fazendo com que diferentes

alelos fossem fixados alternativamente entre as raças. Dentro de uma população F2 originada do cruzamento entre linhagens totalmente endogâmicas, a geração F1 é totalmente heterozigota para todos os marcadores e QTL, o que facilita muito as análises, pois todos os marcadores serão informativos. O mesmo não ocorre quando o cruzamento é realizado entre populações não endogâmicas pois, nem todos os marcadores utilizados serão informativos. Beckmann & Soller (1988) sugeriram uma análise prévia de todos os marcadores e a seleção apenas daqueles marcadores totalmente informativos, para então realizar as análises de associação. Porém, esse processo é muito demorado e torna-se inviável quando o número de marcadores utilizados é muito grande. Segundo Haley & Knott (1992) a utilização de marcadores não informativos acarreta variações entre o poder de detecção do QTL dentro de cada intervalo, podendo alterar a estimação da posição e do efeito do QTL. Haley et al. (1994) propuseram um modelo de análise para superar essas limitações em que toda a informação contida dentro do grupo de ligação é utilizada.

A maioria dos estudos para identificação de QTL em bovinos de leite está restrita a características produtivas, como produção de leite e seus constituintes (Bovenhuis & Schrooten, 2002). Os estudos relacionados à saúde são, na maioria dos casos, relacionados à 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).

## **2.6. Seleção assistida por marcadores moleculares**

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 princípio, a MAS pode selecionar para resistência sem a necessidade de desafios e

apresenta alta acurácia sem a interferência de fatores ambientais. A MAS pode ser considerada uma ferramenta altamente eficaz para auxiliar os programas tradicionais de melhoramento animal. 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 MAS, 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 à 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 raças melhoradas que aumentem a produção em raças nativas adaptadas, ou para transferência de um loco específico associada à resistência das raças adaptadas ou nativas para as raças melhoradas (Beckmann & Soller, 1987).

A detecção da resistência a doenças é um dos maiores objetivos dentro das estratégias do melhoramento, porém, é difícil de realizá-la pelos métodos tradicionais de melhoramento animal. A inexistência de programas de seleção para a resistência a carrapatos pode estar relacionada à dificuldade em se aferir a resistência dos animais rotineiramente, como ocorre com as características produtivas. A incidência de doenças é bastante influenciada por fatores

ambientais então, diferenças fenotípicas podem ser, em grande parte, devido a diferenças entre ambientes. Para fazer avaliações fenotípicas mais precisas são necessários desafios artificiais, em que as características de produção são bastante afetadas pelas infestações, 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 & Andersson, 1998). Em um dos poucos programas de melhoramento para resistência a doenças em bovinos, desenvolvido durante 15 anos, foi verificado que, quando foram selecionados animais resistentes ao carrapato, houve uma diminuição linear do número de carrapatos por animal, sendo que a média observada no início do programa, em 1983, era de 275 carrapatos/animal e passou para 40 carrapatos/animal no final do projeto em 1998 (Frisch *et al.*, 2000). Esses resultados indicam que a seleção de reprodutores resistentes ao carrapato, independente da raça utilizada, pode ser uma alternativa eficiente para a redução dos custos com o controle químico e desta forma contribuem para o aumento dos índices de produtividade do rebanho nacional, e conseqüentemente do retorno econômico da atividade pecuária.

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).

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 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 então 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 e baixos índices de resistência, possibilitará a obtenção de animais com alta produção aliada à maior tolerância em condições adversas (Frisch, 1999).

A utilização da MAS, para resistência ao carrapato bovino, proporcionará uma maior eficiência técnica e econômica dos sistemas de produção, e também possibilitará um menor uso de químicos para o controle deste parasita, 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 regiões genômicas que estejam significativamente associadas à resistência ao carrapato bovino.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Delineamento experimental**

Foram utilizados animais experimentais de uma população F<sub>2</sub>, oriundos de cruzamentos entre animais F<sub>1</sub> (½ Holandês: ½ Gir). A população parental era formada por quatro touros Holandeses e 27 fêmeas da raça Gir. Os indivíduos F<sub>1</sub> foram produzidos por meio de inseminação artificial de fêmeas da raça Gir utilizando sêmen de touros da raça Holandesa. Para isto, foram utilizadas 27 fêmeas Gir em trabalho de superovulação. Os embriões produzidos foram transferidos para receptoras, reduzindo então o tempo necessário para a formação da população. No total foram produzidos 150 animais F<sub>1</sub> dos quais apenas cinco machos foram selecionados para a realização dos cruzamentos que deram origem à população F<sub>2</sub>. Os acasalamentos foram realizados evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. Dessa forma, sessenta e sete fêmeas F<sub>1</sub> foram superovuladas e inseminadas com o sêmen dos touros previamente selecionados. Os embriões formados eram coletados e transferidos para receptoras. Dessa forma, foram formadas cinco grandes famílias de meio-irmãos com aproximadamente 80 animais por família, totalizando 400 animais F<sub>2</sub>. O nascimento dos animais F<sub>2</sub> ocorreu entre os anos 1999 a 2006.

### **3.2. Avaliação do número de carrapatos por animal**

Todos os animais da população F2 foram avaliados quanto à resistência ao carrapato bovino. Dada a importância da precisão na avaliação dessa resistência, foram feitas infestações artificiais, em cada animal, com 10.000 larvas. A determinação do nível de resistência de cada animal foi feita pela contagem das fêmeas de carrapatos que completaram seu ciclo, o que ocorre no 21º dia após a infestação. A primeira infestação artificial não foi necessariamente o primeiro contato do animal com o carrapato, visto que esses parasitas estão presentes naturalmente na fazenda onde esses animais foram criados.

As larvas foram preparadas no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, incubando-se um grama de ovos por seringa (equivalente a 10.000 larvas). As larvas infectantes contidas em cada seringa foram distribuídas uniformemente no topo da região cervical do animal, de modo que as larvas atingissem ambos os lados do corpo.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, em torno de 20 a 30 animais por grupo, sendo mantidos em piquetes, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. As infestações e contagens foram feitas em duas épocas do ano, seca (abril-setembro) e chuvosa (outubro-março), dessa forma, cada animal foi avaliado duas vezes. A ordem das infestações foi determinada de acordo com a formação dos grupos, ou seja, alguns animais foram avaliados inicialmente na estação seca e outros tiveram sua primeira avaliação na estação chuvosa. 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 desprende dos animais.

A cor da pelagem de cada animal foi determinada por *score* visual seguindo a seguinte classificação: 1- animais totalmente claros; 2- predominância clara; 3- predominância escura; 4- totalmente escuro. A espessura da capa foi determinada empregando-se um paquímetro Mitutoyo com precisão de 0,05 mm, em três locais aleatórios do corpo dos animais. Esta medida consiste na medida da espessura da capa com os pêlos acamados naturalmente. Foi medido também o comprimento da capa, que consiste no comprimento do pêlo ainda inserido na pele animal. Em seguida, e no mesmo local de avaliação da espessura da capa, foram extraídas, de cada animal, três amostras de pêlos, utilizando-se um alicate “bico de pato” especialmente adaptado para este fim, com o bico limado, de modo a apresentar bordas afinadas em bisel. Esta amostra, obtida nos mesmos locais onde foi medida as espessuras da capa, foram armazenadas em envelopes de plástico, para posterior contagem e determinação da densidade dos mesmos, calculada a partir do número de pêlos e da área de onde eles foram extraídos.

### **3.3. Extração de DNA**

Amostras de sangue de todos os animais (progenitores Gir, F1 e 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, do qual se extraiu o DNA.

O DNA proveniente de amostras de sangue foi extraído 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 500 $\mu$ L 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 ressuspenso em 1000 $\mu$ L 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 37°C por 2 horas. Foi adicionado a cada amostra 0,2 mg de proteinase K com posterior incubação a 50°C 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 3M e 600 µL de isopropanol. 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, foi utilizado para a extração de DNA do sêmen.

### **3.4. Varredura genômica com marcadores moleculares**

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 em sua posição no mapa, multi-alelismo e mínimo de 50% de heterozigidade. Ao todo, foram selecionados 109 marcadores microssatélites, visando cobrir 17 cromossomos (BTA - *Bos taurus autosome* - 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22, 25 e 28) 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 400 animais F2, totalizando 504 animais.

Com vistas a otimizar a reação de PCR para cada marcador microssatélite, foram testadas três concentrações de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM; 2,0 mM e 2,5 mM) e pelo menos quatro temperaturas de anelamento (TA) para cada par de *primer*. Foi definida então uma condição ótima para cada marcador (Tabela 1). As reações constaram basicamente de 45ng de DNA genômico; 0,2mM de dNTPs; concentração de MgCl<sub>2</sub> definida individualmente; 20mM Tris pH 8,3;

50mM KCl e 0,1  $\mu$ M de cada *primer* num volume total de 10 $\mu$ L. Os *primers forward* foram marcados com três tipos de fluorescência (TAM, HEX ou FAM) objetivando a montagem de *multiplex* para a injeção das amostras para eletroforese. As amplificações contaram com as seguintes etapas: 94°C (1min), TA (1min), 72°C (1min) durante 35 ciclos e uma etapa final para extensão de 45min a 72°C.

Os produtos das reações de PCR foram precipitados utilizando 1  $\mu$ L de acetato de amônio (7,5M) e 30  $\mu$ L de etanol 90%. As placas foram então centrifugadas durante 30 min. O DNA final foi ressuspendido em 20  $\mu$ L de água.

Os produtos das amplificações foram detectados por eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare, NYSE, Germany). Os genótipos foram analisados no programa Fragment Profiler (GE Healthcare, NYSE, Germany) e os dados exportados para uma planilha do Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

**Tabela 1** – Cromossomo (Crom.), nome do marcador, tipo de fluoróforo utilizado para marcar o *primer forward*, temperatura de anelamento (TA - °C) e concentração de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) padronizadas para todos os marcadores utilizados.

Crom.	Marcador	Fluoróforo	TA (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Crom.	Marcador	Fluoróforo	TA (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)
1	1-1B	FAM	52	2,0	11	11-1	FAM	54	2,0
1	1-2	FAM	56	2,5	11	11-2	FAM	52	2,0
1	1-3	TAMRA	52	3,0	11	11-3	TAMRA	54	2,0
1	1-4	FAM	52	3,0	11	11-4	HEX	56	2,0
1	1-5B	TAMRA	56	2,0	11	11-5	TAMRA	52	1,5
1	1-6	HEX	54	3,0	11	11-6	FAM	54	2,0
1	1-7	FAM	58	3,0	12	12-1	HEX	54	1,5
1	1-8	HEX	58	2,5	12	12-2	FAM	54	2,0
2	2-1	HEX	56	1,5	12	12-3	FAM	50	3,0
2	2-2B	HEX	54	1,5	12	12-4B	FAM	50	3,0
2	2-3	HEX	54	3,0	12	12-5	FAM	54	2,0
2	2-4	FAM	52	3,0	12	12-6B	HEX	56	3,0
2	2-5	FAM	56	1,5	15	15-1	HEX	50	2,5
2	2-6B	HEX	56	2,0	15	15-2	FAM	56	1,5
3	3-0	HEX	52	2,5	15	15-3	FAM	52	1,5
3	3-1	FAM	56	2,0	15	15-4	FAM	52	1,5
3	3-2	HEX	54	3,0	15	15-5	FAM	52	1,5
3	3-3	FAM	52	3,0	15	15-6	HEX	48	1,5
3	3-4	TAMRA	52	3,0	16	16-1	HEX	56	1,5
3	3-5	FAM	52	3,0	16	16-2	HEX	52	1,5
3	3-6B	FAM	54	1,5	16	16-3	FAM	50	1,5
4	4-1	TAMRA	54	2,0	16	16-4	FAM	52	1,5
4	4-2	HEX	54	2,0	16	16-5	FAM	52	1,5
4	4-3	TAMRA	60	2,0	16	16-6	HEX	58	2,5
4	4-4	HEX	48	2,0	16	16-7	TAMRA	58	1,5
4	4-5	FAM	54	2,0	17	17-1	HEX	54	1,5
4	4-6	FAM	56	1,5	17	17-2	HEX	52	1,5
6	6-1	FAM	52	1,5	17	17-3	FAM	52	1,5
6	6-2	TAMRA	52	1,5	17	17-4	TAMRA	56	2,5
6	6-3	HEX	54	1,5	17	17-5	HEX	52	2,5
6	6-4	FAM	52	1,5	17	17-6	FAM	54	1,5
6	6-5	TAMRA	56	1,5	17	17-7	TAMRA	52	1,5

**Tabela 1 - Cont...**

<b>Crom.</b>	<b>Marcador</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>TA (°C)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Cromo.</b>	<b>Marcador</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>TA (°C)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>
6	6-6	HEX	52	1,5	20	20-1	HEX	50	2,5
6	6-14	TAMRA	56	1,5	20	20-2	HEX	54	1,5
6	6-7	HEX	52	2,5	20	20-3	FAM	52	1,5
8	8-1	TAMRA	50	1,5	20	20-4	TAMRA	58	1,5
8	8-2	FAM	50	2,0	20	20-5	HEX	50	2,5
8	8-3	HEX	52	2,5	20	20-6	HEX	54	1,5
8	8-4	HEX	48	2,5	22	22-1	HEX	50	2,5
8	8-5	FAM	50	1,5	22	22-2	HEX	52	2,5
8	8-6	HEX	56	1,5	22	22-3	FAM	52	2,0
8	8-7	TAMRA	54	2,0	22	22-4	TAMRA	50	2,5
9	9-1	HEX	56	2,0	22	22-5	HEX	52	2,0
9	9-2	FAM	52	2,0	22	22-6	FAM	54	2,0
9	9-3	HEX	50	2,0	22	22-7	TAMRA	54	2,0
9	9-4	TAMRA	56	1,5	25	25-1	HEX	52	2,0
9	9-5	FAM	58	1,5	25	25-2	HEX	50	2,5
9	9-6	FAM	50	2,0	25	25-3	FAM	52	2,5
9	9-7	FAM	54	2,0	25	25-4B	HEX	54	1,5
10	10-1	FAM	54	2,0	25	25-5B	FAM	54	1,5
10	10-2	FAM	56	1,5	28	28-1	HEX	52	2,5
10	10-3	TAMRA	52	2,0	28	28-2	FAM	52	2,0
10	10-4	HEX	52	1,5	28	28-3	TAMRA	48	2,0
10	10-5	TAMRA	54	1,5	28	28-4	HEX	58	2,0
					28	28-5	FAM	56	2,0

### 3.5. Análises Estatísticas

O cálculo da frequência alélica, heterozigosidade observada (H) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram obtidos com a utilização do programa Cervus v.3.0.3 (Marshall *et al.*, 1998). Os valores de PIC estão diretamente relacionados com o número de alelos detectados para cada marcador e da frequência dos mesmos dentro da população. A fórmula utilizada para a determinação do PIC foi a seguinte:

$$PIC = 1 - \sum_i p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2,$$

$$p_i = K_i / N$$

Em que:  $k_i$  é o número de observações do alelo  $i$  ( $i = 1, \dots, m$ );

$N$  é o número total de informações

Antes de realizar as análises estatísticas, os dados referentes à contagem do número de carrapatos foram transformados, visando à normalização dos mesmos, utilizando o logaritmo decimal da contagem de carrapatos + 1.

Foi realizada uma análise de correlação entre as duas avaliações (seca e chuvosa) para verificar se as mesmas poderiam ser utilizadas como medidas repetidas. As análises de correlações entre as variáveis foram estimadas pelo método de Pearson. As diferenças entre as médias dos tratamentos propostos foram comparadas em nível de 5% de significância.

Para definir quais seriam os efeitos fixos e covariáveis que entrariam no modelo final das análises de QTL, foi realizada uma análise de variância utilizando o programa SAS (SAS Institute, Cary, NC). O modelo geral utilizado foi:

$$y = Xb + e$$

em que:  $y$  é a variável dependente;

$X$  é a matriz de incidência de efeitos fixos (sexo, cor da pelagem, ordem de infestação, grupo\_ano) e covariáveis (idade à contagem, espessura da capa, densidade do pêlo e comprimento da capa).

Por meio da análise de variância realizada para cada estação separadamente (Tabela 2), observou-se que as fontes de variação: grupo\_ano, cor da pelagem, e espessura da capa influenciaram o log da contagem de

carrapato +1 na estação seca e na estação chuvosa apenas grupo\_ano e espessura da capa apresentaram efeitos significativos.

**Tabela 2** – Análise de variância indicando: graus de liberdade (G.L.), valores de F e nível de significância para o logaritmo da contagem de carrapato + 1 nas estações seca e chuvosa.

Efeito	G.L.	F	P
<b>Seca</b>			
Sexo	1	0,02	0,878
Infestação	1	3,25	0,073
Grupo_ano	14	6,40	< 0,0001
Idade à contagem	1	1,13	0,290
Cor da pelagem	3	5,04	0,002
Espessura da capa	1	5,09	0,025
Densidade do pêlo	1	0,64	0,424
Comprimento da capa	1	0,86	0,355
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
<b>Chuvosa</b>			
Sexo	1	0,10	0,755
Infestação	1	1,89	0,170
Grupo_ano	14	14,60	<0,0001
Idade à contagem	1	0,29	0,590
Cor da pelagem	3	1,35	0,259
Espessura da capa	1	6,18	0,014
Densidade do pêlo	1	0,39	0,533
Comprimento da capa	1	2,39	0,123

### **3.6. Construção dos mapas de ligação**

Os mapas de ligação para os 17 cromossomos foram gerados com a utilização do programa Crimap (Green *et al.*, 1990). O Crimap determina a frequência de recombinação e calcula a melhor ordem possível para os marcadores que estão sendo analisados em cada grupo de ligação. A ordenação é realizada utilizando os maiores valores do  $\text{Log}_{10}$  da máxima verossimilhança (LOD). O programa deduz, quando possível, o genótipo dos dados perdidos por meio da análise dos pais destes indivíduos, e realiza a análise de verossimilhança baseada nos dados reais e nos dados deduzidos. Os mapas de ligação foram construídos pelo método da máxima verossimilhança utilizando-se a função de Kosambi para transformar taxas de recombinação em distância de mapa em centiMorgans (cM).

O mapa consenso disponibilizado pelo Marc/USDA, e que serviu de base para a seleção dos marcadores utilizados neste estudo, foi gerado a partir de vários trabalhos que utilizaram diferentes raças, entre elas: Angus, Australian Friesian, Boran, Brahman, Brangus, Charolês, Gelbvieh, Gir, Hereford, Holandês, InduBrasil, Nelore, N'Dama, Normando, Piemontesa, Sahiwal e Simental (Bishop *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 1997). Ihara *et al.*, (2004) acrescentaram mais de 2.300 marcadores microssatélites, dessa forma, atualmente o mapa consenso contém 3960 marcadores incluindo 3.802 microssatélites e 79 SNPs. O comprimento total do mapa de ligação bovino é de 3.160 cM considerando os 29 autossomos mais o cromossomo X e apresenta um espaçamento médio de 1,4 cM. Esse mapa serviu de base para todas as comparações que foram realizadas no presente trabalho.

### **3.7. Análises para detecção de QTL**

As análises para detecção de QTL nos cromossomos estudados foram realizadas por mapeamento de intervalos em população  $F_2$  utilizando o software GridQTL (<http://www.gridqtl.org.uk>) (Seaton *et al.*, 2006).

As análises consistiram, primeiramente, na determinação das probabilidades de Identidade-Por-Descendência (IBD) para localização específica das regiões cromossômicas referentes aos dados de marcadores múltiplos e, posteriormente, adequou o modelo estatístico às observações e aos coeficientes de IBD (Seaton *et al*, 2006). A segunda etapa de análise dos dados consistiu na análise de regressão dos dados fenotípicos e os coeficientes calculados previamente. Esse tipo de análise permitiu adicionar outras variáveis no modelo, como efeitos fixos e covariáveis. Foi possível também estimar os efeitos de dominância, aditividade e realizar a análise visando à identificação de dois QTL ligados.

De acordo com os resultados obtidos na análise de variância, foram utilizados como efeitos fixos: grupo\_ano e cor da pelagem na estação seca e apenas grupo\_ano na estação chuvosa, e como covariável, a espessura da capa nas duas estações avaliadas.

O modelo aditivo e aditivo+dominante utilizados foram, respectivamente:

$$y_{ijk} = G_i + C_j + b(C_{ijk} - \bar{C}) + c_a a + e_{ijk}$$

$$y_{ijk} = G_i + C_j + b(C_{ijk} - \bar{C}) + c_a a + c_d d + e_{ijk}$$

Sendo,

$Y_{ijkl}$  = valor observado - fenótipo

$G_i$  = efeito fixo grupo\_ano;

$C_j$  = efeito fixo cor da pelagem j, j = 1, 2, 3, 4; (somente na estação seca)

$(C_{ijk} - \bar{C})b$  = ajuste para a covariável - espessura da capa;

Os valores  $c_a$  e  $c_d$  são funções das probabilidades condicionais do QTL dado o genótipo dos locos e são calculados da seguinte maneira:

$$c_a = P(QQ) - P(qq) \quad \text{e} \quad c_d = P(Qq)$$

em que:

$P(QQ)$  = é a probabilidade de homozigose para os genótipos do QTL provenientes dos animais de raça Holandesa, dado o marcador ( $M_iM_i$ ;  $M_jM_j$ );

$P(qq)$  = é a probabilidade de homozigose para os genótipos do QTL provenientes dos animais da raça Gir, dado o marcador ( $M_iM_i$ ;  $M_jM_j$ );

$P(Qq)$  = é a probabilidade de heterozigose para os genótipos do QTL, dado o marcador ( $M_iM_i$ ;  $M_jM_j$ );

A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada condicionalmente aos marcadores, a cada um cM ao longo de todo o cromossomo. Essas probabilidades são usadas para fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL para cada animal.

Os limiares de significância a nível cromossômico (1% e 5%) foram calculados no programa GridQTL a partir de testes de permutação (Church e Doerge, 1994). O intervalo de confiança (IC 95%) para a localização do QTL foi obtido usando a aproximação de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), conforme descrito por Pérez-Enciso et al. (2000). As análises foram realizadas utilizando o modelo aditivo e o modelo aditivo+dominante.

A proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL foi calculada da seguinte maneira:

$$\sigma^2 = 100 \times [(SQH_o - SQH_a)^2 / SQH_o]$$

Em que:  $SQH_o$  é a soma de quadrados obtida do modelo reduzido (ausência de QTL)

$SQH_a$  é a soma de quadrados obtida do modelo completo (presença de QTL)

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Mapas de ligação**

Um dos pré-requisitos necessários para a identificação de QTL é a presença de um mapa de ligação com marcadores suficientes que maximizem a cobertura do genoma. Apesar de já ter as informações da localização desses marcadores no mapa consenso, um mapa foi gerado a partir dos dados obtido na população F2 em estudo. Segundo Lynch & Walsh (1998), um mapa de ligação é função do número de marcadores e de animais utilizados e também do tipo de população em estudo, então, foram realizadas novas análises visando à formação de um novo mapa de ligação utilizando os marcadores em estudo.

Para gerar o mapa de cada cromossomo dentro da população F2, foi montada uma planilha em que os dados foram organizados por famílias com as informações de pais e avós para cada conjunto de irmãos completos dentro da população F2. Essa planilha continha informações de 922 indivíduos, levando em consideração as repetições de pais e avós. O número de indivíduos que são analisados para gerar o mapa de ligação está diretamente relacionado com a acurácia do mesmo, pois, quanto maior o número de meioses informativas, maior é a chance de se detectar recombinação entre pequenas distâncias.

Porém, apesar do grande número de indivíduos analisados, para muitas famílias não foi possível determinar a fase de ligação, dessa forma, o marcador que apresentou o maior valor de meioses informativas foi o 2-3 com 721 meioses utilizadas. O número médio de meioses informativas encontradas dentro da população F2 (502) foi próximo ao número médio encontrado no mapa consenso do Marc/USDA (573). Dentro dos 109 marcadores analisados, 74 (67,9%) apresentaram número maior de meioses informativas quando comparados aos dados fornecidos no mapa consenso (Tabela 3).

A ordem dos marcadores não foi alterada após a formação do novo mapa, porém, 10 cromossomos apresentaram tamanho superior ao esperado, levando em consideração as informações disponíveis no mapa consenso. Os cromossomos 4 e 6 foram os que apresentaram maior diferença de tamanho, com um aumento de aproximadamente 43% e 32% respectivamente. Os demais sete cromossomos apresentaram redução no tamanho sendo que o cromossomo 11 foi o que apresentou maior redução (20 cM – 17%). O resumo de todos esses resultados encontra-se na tabela 3.

**Tabela 3:** Comparação entre o mapa consenso, disponibilizado pelo MARC/USDA, e o mapa gerado a partir da população F2 em relação aos dados de posição (Pos.), espaçamento (Esp.) e meioses informativas (M.I.) para os 109 marcadores analisados dentro dos 17 cromossomos (Crom.)

Crom.	Marcador	Mapa Marc*			Mapa F2 Embrapa			Crom.	Marcador	Mapa Marc*			Mapa F2 Embrapa		
		Pos.	Esp.	M. I.	Pos.	Esp.	M. I.			Pos.	Esp.	M. I.	Pos.	Esp.	M. I.
1	1-1B	0,0		288	0,0		371	11	11-1	14,7		289	0,0		629
1	1-2	10,0	10	156	11,8	12	231	11	11-2	35,1	20	814	23,6	24	555
1	1-3	23,9	14	307	26,4	15	535	11	11-3	50,3	15	2053	36,8	13	505
1	1-4	45,3	21	307	44,2	18	605	11	11-4	70,1	20	1073	53,5	17	606
1	1-5B	75,8	31	264	70,7	27	547	11	11-5	97,6	27	526	81,4	28	635
1	1-6	99,7	24	365	95,0	24	561	11	11-6	117,0	19	384	97,1	16	435
1	1-7	113,5	14	982	109,0	14	623	12	12-1	3,1		349	0,0		525
1	1-8	139,3	26	467	141,8	33	702	12	12-2	14,4	11	660	16,1	16	620
2	2-1	3,9		2370	0,0		603	12	12-3	46,3	32	323	65,9	50	411
2	2-2B	28,6	25	208	21,5	22	310	12	12-4B	64,9	19	201	109,6	44	300
2	2-3	60,3	32	280	56,3	35	721	12	12-5	88,2	23	295	129,2	20	504
2	2-4	85,8	26	1392	75,9	20	626	12	12-6B	109,3	21	253	149,0	20	345
2	2-5	110,3	24	717	102,5	27	639	15	15-1	0,0		303	0,0		529
2	2-6B	126,4	16	1206	117,5	15	553	15	15-2	31,2	31	1926	29,5	30	599
3	3-0	0,5		352	0,0		372	15	15-3	41,2	10	322	37,2	8	318
3	3-1	17,1	17	1355	11,5	12	363	15	15-4	58,3	17	314	50,7	14	498
3	3-2	26,5	9	1117	18,5	7	305	15	15-5	77,9	20	336	65,3	15	624
3	3-3	43,3	17	1105	40,4	22	206	15	15-6	101,1	23	275	84,4	19	618
3	3-4	66,3	23	214	66,1	26	590	16	16-1	0,0		186	0,0		475
3	3-5	87,3	21	692	89,0	23	687	16	16-2	15,5	16	274	29,0	29	368
3	3-6B	116,0	29	336	114,1	25	464	16	16-3	30,2	15	299	64,1	35	483
4	4-1	7,9		785	0,0		557	16	16-4	45,6	15	304	84,2	20	558
4	4-2	30,8	23	244	29,4	29	409	16	16-5	62,2	17		97,7	14	438
4	4-3	46,0	15	1016	52,1	23	460	16	16-6	77,9	16		116,4	19	636
4	4-4	63,0	17	827	77,2	25	494	16	16-7	98,6	21		138,1	22	427
4	4-5	91,2	28	235	112,8	36	524								
4	4-6	101,3	10	39	145,0	32	250								

\*Dados retirados do endereço Internet <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html> em 23/06/2008

**Tabela 3 - Cont...**

Crom.	Marcador	Mapa Marc*			Mapa F2 Embrapa			Crom.	Marcador	Mapa Marc*			Mapa F2 Embrapa		
		Pos.	Esp.	M. I.	Pos.	Esp.	M. I.			Pos.	Esp.	M. I.	Pos.	Esp.	M. I.
6	6-1	0,0		2367	0,0		609	17	17-1	0,0		219	0,0		331
6	6-2	20,1	20	170	19,3	19	578	17	17-2	18,8	19	295	17,0	17	409
6	6-3	38,2	18	320	38,2	19	610	17	17-3	34,4	16	260	30,6	14	574
6	6-4	60,2	22	249	59,6	21	666	17	17-4	46,1	12	328	40,1	10	625
6	6-5	82,0	22	132	81,7	22	593	17	17-5	64,0	18	319	61,0	21	557
6	6-6	109,9	28	184	112,7	31	449	17	17-6	78,1	14	215	76,3	15	391
6	6-14	121,5	12	330	122,0	9	455	17	17-7	94,0	16	311	101,7	25	626
6	6-7	134,4	13	212	177,7	13	346	20	20-1	0,6		241	0,0		450
8	8-1	11,3		970	0,0		281	20	20-2	16,8	16	284	10,6	11	577
8	8-2	31,4	20	2065	36,4	36	393	20	20-3	30,1	13	212	21,1	11	677
8	8-3	50,1	19	347	68,9	33	368	20	20-4	45,6	16	311	42,5	21	441
8	8-4	66,0	16	2195	96,2	27	406	20	20-5	60,4	15	277	51,8	9	584
8	8-5	77,5	11	318	106,6	10	614	20	20-6	82,9	23	153	74,2	22	591
8	8-6	92,7	15	1883	121,3	15	557	22	22-1	1,3		274	0,0		519
8	8-7	118,7	26	668	149,2	28	375	22	22-2	21,9	21	270	21,4	21	628
9	9-1	12,8		786	0,0		574	22	22-3	31,5	10	293	29,4	8	497
9	9-2	26,3	14	1500	13,0	13	571	22	22-4	44,6	13	246	40,3	11	373
9	9-3	42,5	16	600	33,9	21	414	22	22-5	61,9	17	329	62,5	22	392
9	9-4	50,0	8	755	43,3	9	549	22	22-6	76,4	15	285	78,7	16	399
9	9-5	71,5	21	289	64,8	22	280	22	22-7	88,1	12	283	91,0	12	713
9	9-6	86,6	15	1959	81,1	16	368	25	25-1	3,6		327	0,0		540
9	9-7	103,7	17	1069	101,6	21	559	25	25-2	15,5	12	345	15,9	16	501
10	10-1	24,7		294	0,0		609	25	25-3	30,8	15	302	32,1	16	493
10	10-2	31,6	7	683	9,1	9	669	25	25-4B	43,3	12	292	50,3	18	366
10	10-3	53,9	22	243	31,7	23	586	25	25-5B	68,4	25	698	84,4	34	542
10	10-4	79,0	25	914	72,4	41	392	28	28-1	0,0		202	0,0		312
10	10-5	109,4	30	1200	102,8	30	583	28	28-2	14,8	15	337	26,7	27	572
								28	28-3	29,2	14	354	45,1	18	628
								28	28-4	45,9	17	300	60,4	15	569
								28	28-5	61,7	16	304	77,5	17	450

\*Dados retirados do endereço Internet <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html> em 23/06/2008

## 4.2. Scoring dos marcadores microssatélites

O *scoring* dos alelos dos marcadores microssatélites foi feito primeiramente para a população parental, em que foram identificados todos os alelos que existiam na população em estudo. Os possíveis 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. O *bin set* ajustado auxiliou no *scoring* dos demais animais e manteve um padrão para a detecção dos alelos que foi mantido dentro das cinco placas de PCR analisadas. Esse procedimento facilitou muito as análises e proporcionou um *scoring* mais preciso, diminuindo então a chance de erros durante essa etapa.

Foram realizadas 54.936 genotipagens referentes aos 504 animais analisados (400 F2, 73 F1 e 31 Parentais) x 109 marcadores. A partir das análises genotípicas realizadas para toda a população experimental, foi possível identificar 813 alelos para os 109 marcadores analisados, o que confere uma média de 7,5 alelos por marcador. Seis marcadores apresentaram apenas três alelos na população F2 (1-1B, 2-2B, 4-6, 9-5, 9-6 e 16-1) e o máximo de alelos detectados em um único marcador foram 12 (12-3 e 20-3) (Tabela 4). A média do número de alelos detectados na população parental Gir foi de 6,1 enquanto que na população Holandesa foi de apenas 3,4 alelos por marcador. Essa grande diferença ocorreu possivelmente, pois apenas 4 animais holandeses foram analisados, já na raça Gir 27 fêmeas foram avaliadas. Ao se comparar o número de alelos obtidos na população F2 com os dados presentes no mapa consenso, foi possível observar que grande maioria dos marcadores apresentava mais alelos no mapa consenso. Isso já era esperado visto que, para a formação do mapa consenso, foram utilizadas muitas populações e uma grande variedade de raças, o que confere uma maior diversidade. Para a formação da população F2 foram utilizadas apenas duas raças e um número bastante reduzido de animais, conseqüentemente, a diversidade presente nessa população é bem menor se comparada à população de referência do

MARC. Apenas 26 marcadores (23,8%) apresentaram mais alelos na população F2 do que no mapa consenso, 11 (10,1%) apresentaram o mesmo número de alelos e os demais 72 (66,1%) apresentavam menos alelos quando comparados ao mapa consenso.

Foi possível identificar 40 novos alelos que apresentavam tamanho em pares de base fora da faixa indicada no mapa de referência do Marc. Foram encontrados alelos bem distantes do tamanho máximo pré-determinado para o marcador 20-6 (60 pb). Os demais alelos identificados estavam, em média, a 8 pares de bases do tamanho esperado. A identificação de novos alelos dentro de uma população de animais zebuínos reforça a necessidade de um maior conhecimento molecular para essas raças, uma vez que o rebanho bovino brasileiro é constituído, na sua maioria, por raças zebuínas. A escassez de conhecimento a respeito dessa diversidade genômica pode comprometer, ou reduzir a confiabilidade, na utilização de marcadores para seleção assistida por marcadores e também na realização de testes de paternidade.

**Tabela 4** – Número de alelos (N), heterozigosidade observada (Het.), conteúdo de informação polimórfica (PIC), tamanho mínimo (Min) e máximo (Max.) em pares de bases e porcentagem de falhas de PCR (% F) obtidos na população F2 para os 109 marcadores microssatélites analisados.

Marc.	N	Het.	PIC	Min	Max	% F	Marc.	N	Het.	PIC	Min	Max	% F
1-1B	3	0,55	0,48	214	220	9,2	11-1	8	0,85	0,81	240	264	9,2
1-2	6	0,45	0,51	113	135	27,9	11-2	6	0,81	0,75	76	98	8,3
1-3	7	0,80	0,72	108	120	4,4	11-3	7	0,75	0,67	209	233	4,6
1-4	10	0,85	0,75	182	216	5,8	11-4	9	0,83	0,80	143	165	3,8
1-5B	7	0,75	0,67	148	162	5,6	11-5	8	0,88	0,75	103	127	7,7
1-6	6	0,83	0,71	220	252	2,9	11-6	6	0,67	0,59	132	158	9,2
1-7	9	0,86	0,80	100	122	2,3	12-1	8	0,68	0,68	126	160	8,1
1-8	8	0,80	0,75	113	151	1,1	12-2	8	0,89	0,81	151	169	5,0
2-1	8	0,92	0,82	158	178	4,0	12-3	12	0,91	0,84	104	140	16,8
2-2B	3	0,67	0,57	145	151	4,7	12-4B	5	0,66	0,56	200	210	9,0
2-3	10	0,91	0,85	124	150	4,8	12-5	6	0,71	0,61	234	244	3,3
2-4	6	0,86	0,75	132	150	2,6	12-6B	4	0,69	0,59	204	220	9,9
2-5	10	0,83	0,79	102	132	6,1	15-1	11	0,94	0,83	186	214	8,6
2-6B	8	0,89	0,80	132	150	14,3	15-2	7	0,87	0,76	219	243	7,3
3-0	8	0,72	0,62	195	211	11,9	15-3	4	0,69	0,58	114	124	6,5
3-1	4	0,58	0,48	99	113	2,2	15-4	7	0,82	0,72	181	195	5,1
3-2	4	0,38	0,35	85	95	2,2	15-5	9	0,85	0,78	271	295	10,3
3-3	8	0,38	0,35	235	269	4,8	15-6	9	0,79	0,76	178	206	8,3
3-4	7	0,80	0,76	100	122	6,4	16-1	3	0,71	0,59	119	125	6,7
3-5	8	0,85	0,79	191	217	3,6	16-2	4	0,59	0,50	191	211	7,0
3-6B	6	0,72	0,61	178	206	2,6	16-3	5	0,77	0,67	201	213	6,1
4-1	5	0,69	0,67	97	111	6,5	16-4	6	0,76	0,69	194	224	9,1
4-2	5	0,69	0,63	110	162	11,5	16-5	5	0,66	0,58	259	271	5,5
4-3	6	0,78	0,69	118	140	12,8	16-6	6	0,81	0,68	180	208	5,7
4-4	10	0,76	0,73	114	144	10,6	16-7	7	0,57	0,51	192	208	6,7
4-5	6	0,82	0,77	142	162	10,5	17-1	6	0,49	0,44	165	177	9,6
4-6	3	0,50	0,41	124	128	8,5	17-2	5	0,55	0,53	262	276	8,6
6-1	10	0,78	0,67	180	202	1,8	17-3	9	0,79	0,77	192	218	7,3
6-2	5	0,78	0,67	204	220	6,5	17-4	6	0,84	0,73	162	182	7,0
6-3	6	0,80	0,75	133	171	4,0	17-5	8	0,93	0,79	160	192	7,3
6-4	9	0,83	0,74	133	155	4,5	17-6	8	0,76	0,71	205	229	7,8
6-5	7	0,77	0,71	214	228	5,9	17-7	8	0,85	0,74	204	228	6,8

**Tabela 4 – Cont...**

<b>Marc.</b>	<b>N</b>	<b>Het.</b>	<b>PIC</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>% F</b>	<b>Marc.</b>	<b>N</b>	<b>Het.</b>	<b>PIC</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>% F</b>
6-6	4	0,66	0,58	205	217	2,3	20-1	8	0,58	0,58	249	263	1,7
6-14	5	0,75	0,65	215	225	0,8	20-2	8	0,72	0,66	156	176	1,8
6-7	4	0,47	0,45	111	114	3,4	20-3	12	0,89	0,81	294	366	2,0
8-1	5	0,42	0,55	104	122	25,4	20-4	6	0,78	0,69	322	336	3,4
8-2	6	0,62	0,51	121	133	8,1	20-5	6	0,82	0,71	282	304	2,2
8-3	7	0,66	0,65	99	123	11,9	20-6	9	0,77	0,71	164	242	7,3
8-4	5	0,71	0,65	160	168	12,0	22-1	5	0,67	0,64	109	123	3,9
8-5	9	0,89	0,78	154	178	10,6	22-2	8	0,84	0,78	185	205	4,6
8-6	8	0,85	0,79	159	185	12,2	22-3	6	0,74	0,66	195	211	5,4
8-7	5	0,67	0,53	146	162	7,1	22-4	5	0,74	0,55	165	177	4,6
9-1	7	0,84	0,79	138	158	8,2	22-5	5	0,74	0,61	168	182	2,9
9-2	7	0,90	0,78	251	277	8,6	22-6	6	0,66	0,66	139	161	1,6
9-3	7	0,76	0,69	116	134	8,0	22-7	9	0,88	0,81	178	210	4,9
9-4	7	0,84	0,77	93	111	9,1	25-1	10	0,74	0,72	189	235	4,1
9-5	3	0,92	0,55	108	112	10,7	25-2	8	0,84	0,81	97	129	10,4
9-6	3	0,66	0,56	94	104	4,6	25-3	6	0,68	0,57	253	275	2,9
9-7	9	0,82	0,80	123	145	11,0	25-4B	5	0,74	0,64	185	197	3,8
10-1	9	0,85	0,77	186	224	3,1	25-5B	5	0,64	0,64	126	152	7,6
10-2	8	0,90	0,83	77	109	3,9	28-1	4	0,42	0,35	210	218	3,0
10-3	7	0,76	0,73	99	119	8,5	28-2	8	0,84	0,74	213	243	4,6
10-4	5	0,68	0,60	120	142	3,2	28-3	10	0,83	0,81	173	199	5,0
10-5	8	0,83	0,75	102	122	5,3	28-4	7	0,76	0,79	207	239	5,6
							28-5	6	0,82	0,71	265	281	1,9

Nas populações F<sub>2</sub>, 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). Como mencionado anteriormente, a formação de populações F<sub>2</sub> em animais domésticos não segue totalmente as regras pré-estabelecidas, que partem do princípio que as raças/linhagens parentais são 100% contrastantes. Isso ficou bem evidenciado nesse estudo, pois foi possível identificar que 28% dos alelos detectados eram compartilhados entre as duas raças parentais. Foram detectados 440 alelos (54,1%) presentes apenas entre os animais da raça Gir e 145 alelos (17,8%) encontrados apenas na raça Holandesa. Porém, a metodologia proposta por Haley *et al.* (1994) propõe a utilização de um modelo de análise que supera as limitações de ausência de alelos fixados alternativamente entre as duas populações parentais, sendo que nesse modelo toda a informação contida dentro do grupo de ligação é utilizada.

Após a genotipagem de toda a população foi possível quantificar uma média de 7% de falhas dentro de toda a população analisada (Parental, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>). Esse valor está dentro do esperado visto que a qualidade de algumas amostras de DNA mais antigas comprometeram as reações e que falhas ocasionais, tanto na etapa de reação em cadeia da polimerase quanto na etapa de injeção das amostras no seqüenciador automático, ocorrem normalmente. O marcador com menor número de falhas foi o 6-14 (0,8%) enquanto que o marcador 1-2 foi o que apresentou maior número de falhas (27,9%) (Tabela 3).

Foi possível detectar também a presença de alelos nulos dentro da população em estudo. Segundo Callen *et al.*, (1993), alelo nulo seria qualquer mutação que ocorre na seqüência de DNA complementar do oligonucleotídeo iniciador, que pode impedi-lo de ligar-se, resultando em redução ou perda completa de produto. Este fato leva à detecção de um excesso de homozigotos ou falhas completas, resultando em estimativas incorretas de freqüências alélicas. A presença de alelos nulos pode ocorrer em homozigose e, neste caso, esta é confundida com falha de PCR (ausência do produto da PCR), ou pode ocorrer em heterozigose, em que os heterozigotos aparecem como

homozigotos, implicando em excesso de homozigotos na população, o que pode causar erros nas análises estatísticas que dependem das frequências alélicas (Callen *et al.*, 1993; Engel *et al.*, 1996). A detecção de alelos nulos dentro da população em estudo foi possível, pois antes da formação dos mapas de ligação, a genealogia de toda a população é conferida, logo, erros de genotipagem são identificados. Dessa forma, animais que aparentemente eram homozigotos, porém o genótipo não conferia com os parentais eram tidos como falhas. Dessa forma, os marcadores 1-2, 12-3 e 25-2 apresentaram grande quantidade de falhas devido à presença de alelos nulos. A presença de alelos nulos dentro da população F2 pode comprometer as análises de associação visando à identificação de QTL, dessa forma, seria necessária a substituição desses marcadores.

#### **4.3. Diversidade dos marcadores moleculares**

Com o objetivo de verificar o grau de polimorfismo existente dentro de cada marcador, foram realizadas análises para determinar o grau de heterozigosidade (H) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). A heterozigosidade de um loco é definida como a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto para o loco em questão considerando a população como um todo. A média da heterozigosidade observada dentro dos animais F2 foi de 0,75, sendo que os marcadores 3-2 e 3-3 obtiveram o menor valor (0,38), já o marcador 15-1 foi o que apresentou maior valor de heterozigosidade observada (0,94) (Tabela 3). Os valores de heterozigosidade são muito utilizados para definir o número de marcadores necessários para expandir um mapa de ligação ou para determinar o número de animais e marcadores necessários para o mapeamento de QTL (Bishop *et al.*, 1994). Segundo a classificação de Ott (1992) é possível afirmar que todos os marcadores avaliados nesse estudo são polimórficos ou altamente polimórficos, pois, um loco é considerado polimórfico se  $H > 0,10$  e altamente polimórfico se  $H > 0,70$ . Outro índice que pode ser utilizado para verificar o grau de polimorfismo em uma população é o PIC. Este

é considerado como uma estimativa da probabilidade de se obter cruzamentos informativos. Quando um marcador apresenta grande número de alelos, os valores de PIC são muito semelhantes à heterozigosidade esperada e, à medida que o número de alelos aumenta tanto PIC quanto a heterozigosidade tendem a aumentar (Liu, 1998). A média dos valores de PIC dentro da F2 foi de 0,67, o que é considerado altamente polimórfico segundo Botstein, *et al.* (1980). O marcador que apresentou maior valor de PIC foi o 2-3 (0,85) (Tabela 3).

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, 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.

#### **4.4. Análise para a resistência ao carrapato na população F2**

Teodoro (2006) estimou a herdabilidade da população em questão e obteve um valor de  $0,21 \pm 0,12$  para o logaritmo da contagem de carrapato + 1. Dessa forma, é possível afirmar que existe variação genética dentro da população F2.

As análises de contagem do número de carrapatos foram realizadas em duas estações bem distintas visando identificar diferentes mecanismos de resposta à infestação por carrapatos. A estação chuvosa corresponde ao intervalo entre os meses de outubro até março, em que as temperaturas são elevadas e também ocorre grande volume de chuva. A média de temperatura nesta estação na região de Santa Mônica, onde os animais ficavam, era de aproximadamente 30,2°C (máxima) e 18,3 °C (mínima) sendo que a umidade relativa do ar era em média 69,3%, com uma precipitação média mensal de 146,39 mm. Já a estação seca corresponde ao intervalo entre os meses de abril a setembro em que o volume de chuva é bastante reduzido e as temperaturas

são mais amenas. A média de temperatura durante esse período no local em que os animais se encontravam era de aproximadamente 26,4 °C (máxima) e 12,9°C (mínima), com uma média de 69,6% de umidade relativa do ar e 15,5 mm de precipitação média mensal. É possível observar que a média de temperaturas não variou muito entre as duas estações, mas o que mais diferencia uma estação da outra é a média de precipitação mensal, que apresenta uma variação de quase 10 vezes.

A média do número de carrapatos por animal não diferiu estatisticamente entre as estações seca e chuvosa, com valores médios de 43,85 na seca e 40,62 na estação chuvosa. O número máximo de carrapatos na estação chuvosa foi de 792 e na estação seca o máximo foi 426 carrapatos/animal. Fraga *et al.*, (2003) analisando animais em condições climáticas semelhantes às desse estudo encontrou um pico de infestação por carrapatos durante o verão com queda pronunciada na primavera. Diversos trabalhos apontam diferentes épocas em que são detectados picos de carrapatos. Andrade *et al.*, (1998) encontraram médias elevadas no número de carrapatos por animal no outono. Oliveira *et al.*, (1989) verificaram efeito sazonal significativo, sendo o outono e o inverno as estações de maior infestação. Essa variação entre as estações em que são encontrados picos de infestações está diretamente relacionada com as condições climáticas de cada região, além do que, tem que ser levado em consideração o genótipo do animal, o estado nutricional dos animais, o manejo, as pastagens e as possíveis interações entre eles (Fraga *et al.*, 2003). Neste trabalho, apesar de ter sido avaliado o número de carrapatos por animal em condições bastante diferenciadas, não foi possível identificar diferenças entre as médias das duas estações. Isso provavelmente ocorreu, pois o ciclo do carrapato é muito influenciado por fatores ambientais durante a sua fase de vida livre, que pode variar muito no número de dias dependendo diretamente da temperatura e umidade relativa do ar. Nesse trabalho as infestações foram realizadas de forma artificial, e o ciclo do carrapato, durante a fase parasitária, é quase constante, independente das condições climáticas do ambiente. Com relação às demais condições ambientais que poderiam

influenciar no número de carrapatos por animal, como por exemplo, pastagem e manejo, não houve diferença entre esses fatores durante as duas estações, visto que o experimento foi delineado visando controlar ao máximo os efeitos ambientais, proporcionando assim identificar o máximo da variação genética entre os animais.

Nas análises de correlação para o log da contagem + 1 foi encontrado um valor de 0,36 entre a estação seca e a chuvosa e para a contagem direta do número de carrapatos a correlação foi de 0,32. Isso indica que as medidas realizadas em cada estação foram bastante diferentes, assim, não foi possível utilizá-las como medidas repetidas. Dessa forma, as duas avaliações foram consideradas como duas características distintas, e as análises subsequentes foram realizadas individualmente para cada estação. Apesar de não ter sido encontrada uma diferença entre as médias das duas estações, a resposta individual de cada animal foi diferente em cada estação. As condições climáticas não influenciam o ciclo do carrapato na fase parasitária, mas podem alterar a resposta imunológica que cada animal irá oferecer após a infestação artificial. Como a população F2 é bastante diversificada, o estresse calórico causado na estação chuvosa tem respostas diferenciadas de animal para animal, dessa forma, quando é avaliada a média geral não é possível identificar diferenças, apesar de a correlação ser baixa entre as duas estações.

Muitos trabalhos já relataram a influência da cor no número de carrapatos por animal, sendo que na grande maioria destes, as maiores médias do número de carrapatos foram encontradas em animais escuros (Oliveira & Alencar, 1987; Andrade *et al.*, 1998; Veríssimo *et al.*, 1997). A explicação mais relatada seria que animais de pelagem mais escura sofrem mais com o calor, o que acarretaria uma queda no nível de resistência desses animais. Porém, no presente trabalho a cor da pelagem só foi significativa no inverno, em que as temperaturas são mais amenas, dessa forma, a relação entre estresse calórico e queda no nível de resistência não pode ser aplicada nesse caso. Outra explicação seria que, em animais de pele escura, os carrapatos ficam camuflados, dificultando assim a predação por pássaros, e com isso animais

mais escuros apresentariam mais carrapatos (Martinez *et al.*; 2006). Muitos pássaros, por exemplo, garças, costumam ficar sobre os bovinos para se alimentar de insetos e carrapatos. Já foi constatado que essas aves realizam uma verdadeira varredura nos pastos ao redor do gado, alimentando-se dos insetos e carrapatos em toda a área em uma relação ecológica de protocooperação. As garças costumam ser mais freqüentes no inverno, pois a distribuição é mais ampla do que na época reprodutiva, devido à dispersão dos indivíduos, que não se restringem às zonas circundantes às colônias. Assim, as zonas de maior abundância da espécie correspondem a locais particularmente favoráveis à alimentação e a áreas próximas de dormitórios. Geralmente as garças são vistas em locais secos e de pastagem, próximas ao gado (Sick, 1997). Essa então pode ser uma explicação mais plausível para a relação entre cor e número de carrapatos. A média dos quadrados mínimos indicou que quanto mais escuro o animal maior foi o número de carrapatos encontrado sobre os mesmos, o que está de acordo com o esperado (Tabela 5).

A espessura da capa teve efeito significativo dentro das duas estações avaliadas. Essa característica está diretamente relacionada com o número de carrapatos por animal. Segundo Bonsma & Pretorius (1946) animais mais resistentes ao carrapato possuem pêlos curtos, lisos e assentados enquanto que animais mais susceptíveis apresentam pêlos longos, finos e lanosos. A maior espessura da capa pode favorecer o parasita, pois estabelece um microclima que é favorável à permanência do mesmo sobre o animal. Além disso, animais com capas mais espessas dificultam a prática de autolimpeza realizada pelo animal, sendo que esse comportamento é um dos elementos que mais interferem na expressão da resistência.

O número de carrapatos não diferiu significativamente entre a primeira e a segunda infestação. Segundo Rieck (1962) a resistência ao carrapato pode ser dividida em dois tipos, resistência inata e resistência adquirida. A resistência inata já está presente no animal mesmo que este nunca tenha tido contato com o carrapato anteriormente e a resistência adquirida, como o próprio nome diz, está relacionada com a resistência que o animal adquire após ser infestado

algumas vezes por carrapatos. Vários estudos mostram que o nível de resistência dos animais é maior após varias infestações, quando comparados aos níveis encontrados na primeira infestação (Roberts, 1968; Wagland, 1975). Isso não foi observado no presente trabalho, pois a média do número de carrapatos por animal não foi diferente entre as duas infestações. Isso ocorreu provavelmente, pois a primeira infestação artificial não foi necessariamente o primeiro contato do animal com o parasita, dessa forma, a resposta observada não foi diferente entre as duas infestações, pois os animais já haviam tido contato com carrapatos naturalmente presentes nas pastagens antes da primeira infestação.

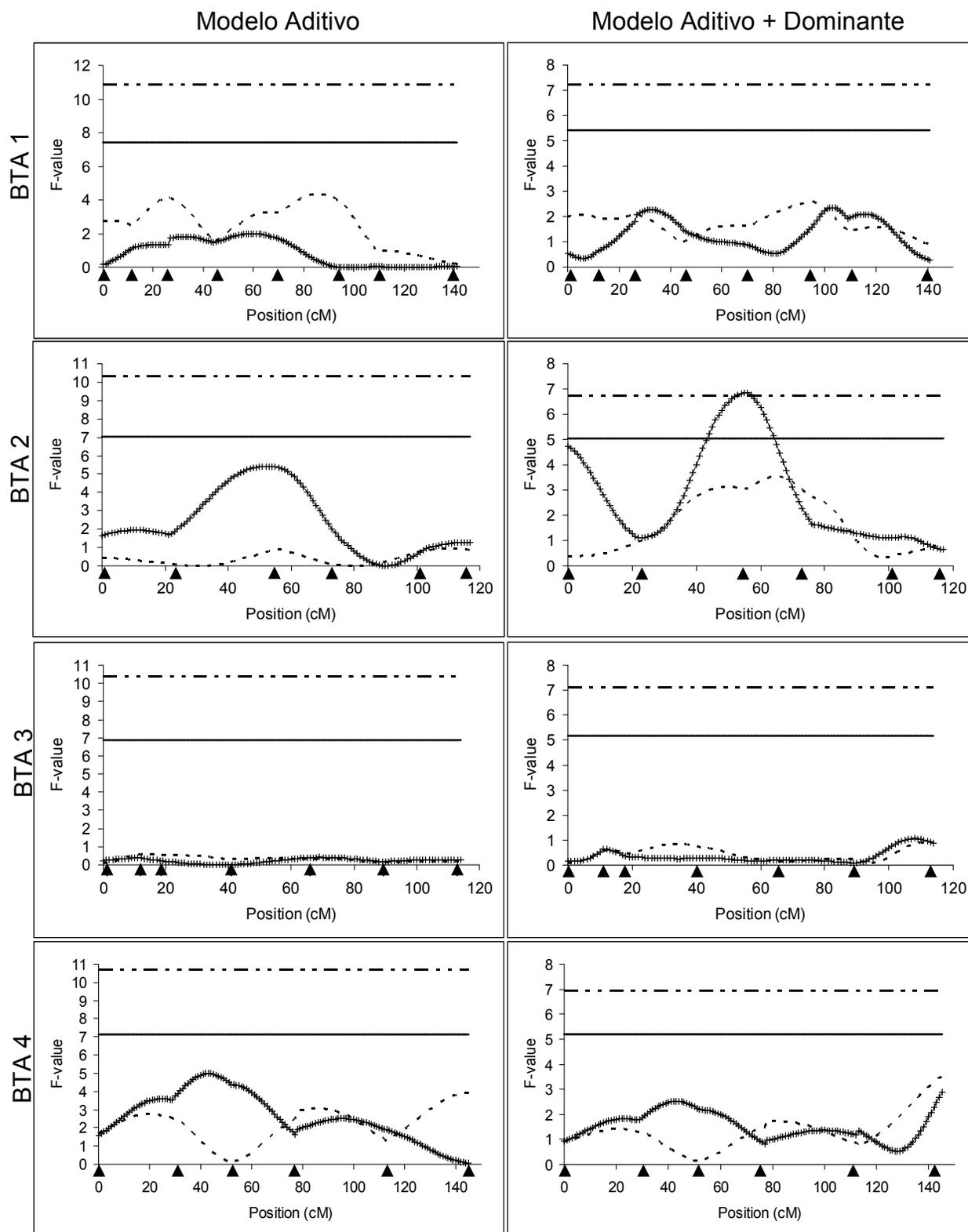
**Tabela 5** - Média dos quadrados mínimos (MQM) e erro padrão (EP) para o logaritmo da contagem de carrapato + 1 para as variáveis: sexo, infestação e cor da pelagem nas estações seca e chuvosa.

<b>Variável</b>	<b>MQM</b>	<b>EP</b>
Seca		
Sexo		
Macho	2,99	0,10
Fêmea	3,01	0,11
Infestação		
Primeira	3,24	0,16
Segunda	2,76	0,16
Cor da pelagem		
Totalmente clara	2,47	0,26
Predominância clara	2,86	0,14
Predominância escura	3,23	0,07
Totalmente escura	3,43	0,17
-----		
Chuvosa		
Sexo		
Macho	2,87	0,12
Fêmea	2,83	0,14
Infestação		
Primeira	3,07	0,19
Segunda	2,63	0,20
Cor da pelagem		
Totalmente clara	2,63	0,30
Predominância clara	2,70	0,17
Predominância escura	2,94	0,10
Totalmente escura	3,11	0,19

#### 4.5. Mapeamento de QTL

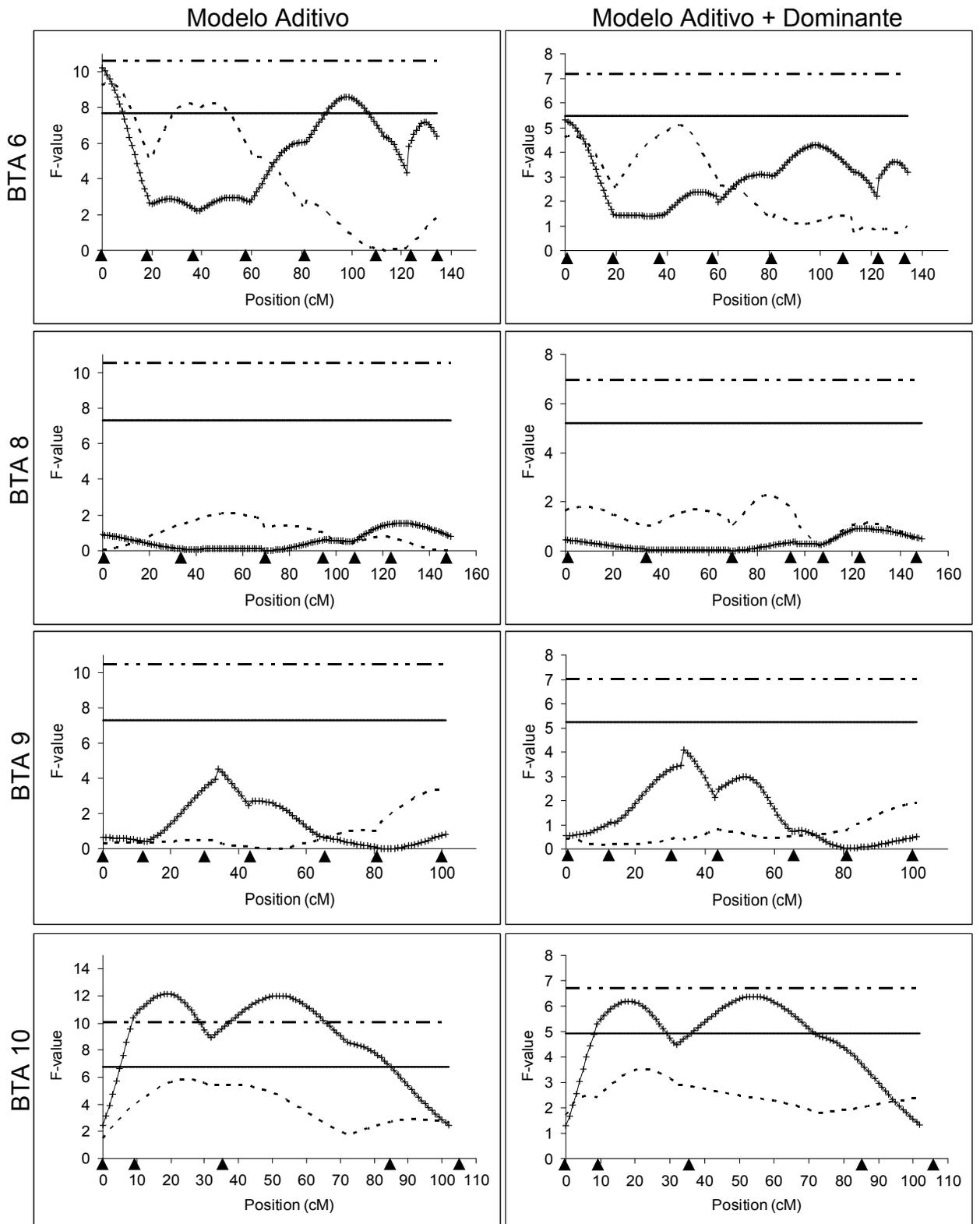
As análises visando identificar possíveis QTL na população F2 foram realizadas para cada um dos 17 cromossomos dentro das duas estações avaliadas (seca e chuvosa). Foi realizada uma análise de regressão visando identificar possíveis associações entre os dados fenotípicos e os dados genotípicos. Foi possível encontrar QTL em 4 cromossomos (BTA2, BTA6, BTA10 e BTA11) sendo que para a maioria dos QTL detectados, a resposta encontrada entre as duas estações foi totalmente diferente (Fig. 1 a 4).

No cromossomo 2 foi identificado um QTL ( $P < 0,01$ ) com efeito dominante na estação seca, localizado na região central do cromossomo (Figura 1). A média do log da contagem + 1 nesse cromossomo foi de  $1,76 \pm 0,30$  sendo que o efeito dominante é responsável por uma alteração de  $-0,31 \pm 0,11$  na média (Tabela 6). O efeito aditivo não foi significativo, portanto esse QTL possivelmente apareceu devido à interação entre alelos presentes nessa população em que os animais heterozigotos apresentaram menor número de carrapatos se comparados à média dos animais homozigotos, visto que o efeito dominante é negativo. Segundo Schuster & Cruz (2004) a variância atribuída aos desvios de dominância deve ser avaliada em um programa de melhoramento, pois esta é um fator perturbador na identificação de genótipos superiores em populações segregantes.



**Figura 1**– Valores de F para os cromossomos 1, 2, 3 e 4. As setas indicam a posição dos marcadores. — 5%, - - - 1%, ..... seca, - · - · - chuvosa.

As análises realizadas no cromossomo 6 indicaram a presença de três QTL ( $P < 0,05$ ) sendo que apenas um foi identificado nas duas estações. Na estação seca foi identificado um QTL na região centromérica do cromossomo e outro próximo de 100 cM, e na estação chuvosa, foi identificado o mesmo QTL já detectado na estação seca no início do cromossomo e outro próximo a 40 cM (Figura 2). Todos os QTL apresentaram efeito aditivo significativo e a média na estação seca foi de  $1,59 \pm 0,29$  sendo que o efeito aditivo causa uma alteração de  $0,24 \pm 0,07$  na média (Tabela 6). Na estação chuvosa a média foi de  $2,70 \pm 0,28$  e o efeito aditivo causa uma alteração de  $0,27 \pm 0,09$  na média (Tabela 7). Nas duas estações avaliadas o efeito aditivo foi positivo, o que significa que os alelos oriundos da raça Holandesa acarretam aumento do número de carrapatos por animal. Esse efeito já era esperado visto que os animais holandeses são muito mais susceptíveis às infestações por carrapatos se comparados aos animais da raça Gir. Quando os dados foram analisados utilizando o modelo aditivo e dominante não foram detectados QTL com efeito significativo nesse cromossomo. O cromossomo 6 é um dos cromossomos bovinos mais estudados, pois neste cromossomo já foram identificados muitos QTL relacionados à produção de leite. Atualmente existem mais de 100 QTL (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/browse>) já identificados, alguns para mastite e score de células somáticas (Klungland *et al.*, 2001) e a grande maioria para características relacionadas à produção de leite (Olsen *et al.*, 2004). Abatepaulo *et al.*, (2008) detectaram diferença na frequência alélica de um SNP do gene CXCL10 localizado no cromossomo 6 quando compararam raças resistentes e susceptíveis ao carrapato, porém, não fizeram estudos de associação para detectar se realmente esse polimorfismo está relacionado com o processo de resistência. O cromossomo 6 de bovino apresenta mais de 111 milhões de pares de bases e já foram identificados 424 genes que codificam proteínas já conhecidas, 129 genes que codificam proteínas recentemente descobertas, 36 pseudogenes, 56 genes que codificam diferentes tipos de RNAs e 98.411 SNPs já identificados ([http://www.ensembl.org/Bos\\_taurus/index.html](http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html)).



**Figura 2**– Valores de F para os cromossomos 6, 8, 9, 10. As setas indicam a posição dos marcadores. — 5%, - - - 1%, ..... seca, - · - · - chuvosa.

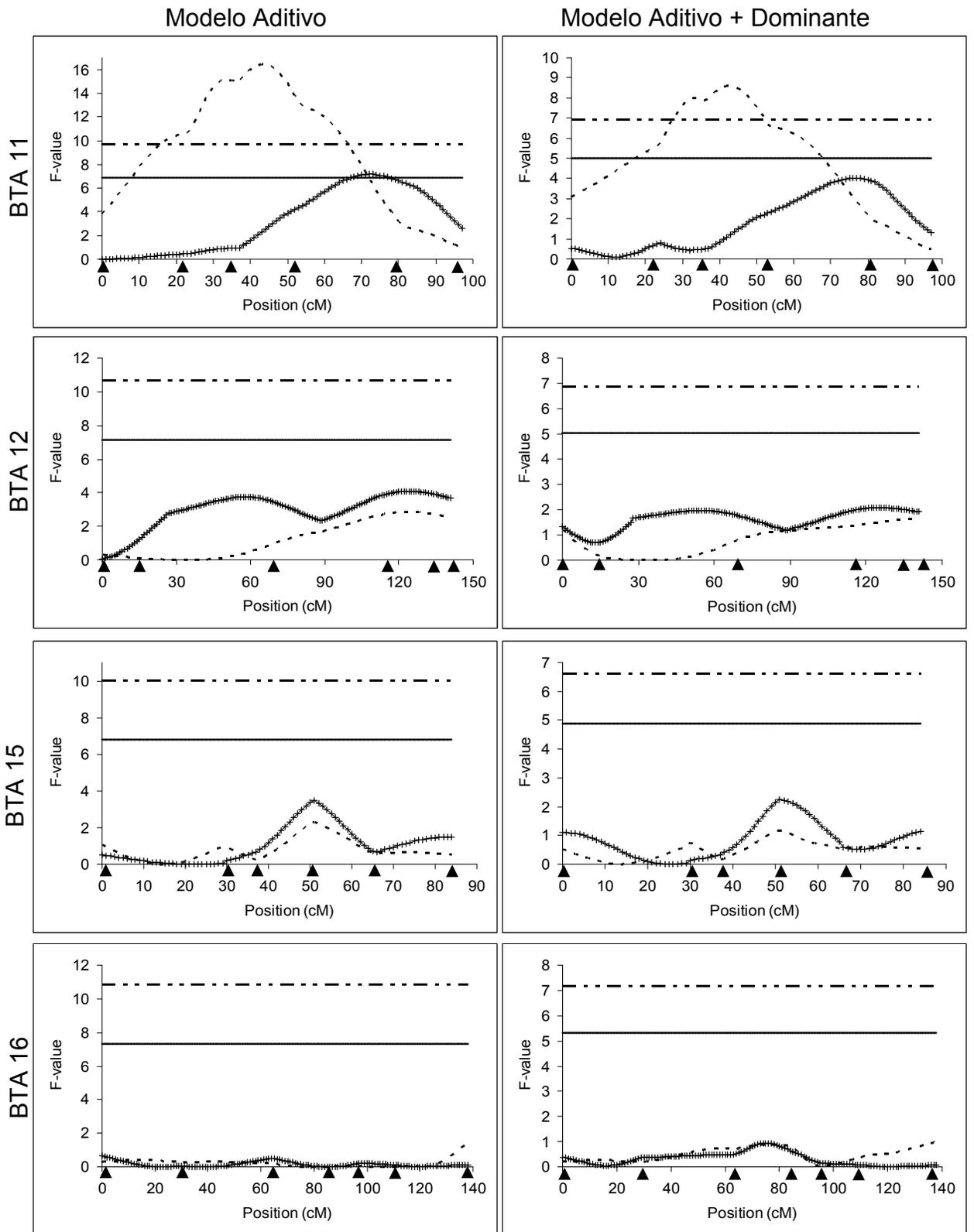
No cromossomo 10 foi possível identificar dois QTL ( $P < 0,01$ ) na estação seca, um próximo de 20 cM e outro próximo de 60 cM (Figura 2). A média do log de carrapato + 1 para esse cromossomo foi de  $1,67 \pm 0,29$  em que o efeito aditivo provoca uma alteração de  $0,32 \pm 0,09$  na média. Esses QTL identificados são responsáveis por 3,81% de toda a variação fenotípica da característica (Tabela 6). Utilizando o modelo aditivo e dominante o QTL permaneceu, porém com nível de significância menor ( $P < 0,05$ ), mas a maior contribuição continuou sendo do efeito aditivo, de maneira que o efeito dominante não foi significativo. Na estação chuvosa não foi identificado QTL. O efeito aditivo positivo detectado nesses QTL representa que a raça Holandesa contribui com alelos que acarretam aumento do número de carrapatos por animal. Atualmente existem mais de 20 QTL (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/browse>) detectados nesse cromossomo, porém a maioria está relacionada com caracteres produtivos (Ashwell *et al.*, 2004). O BTA10 possui mais de 95 milhões de pares de bases em que já foram identificados 659 genes relacionados a proteínas já conhecidas, 181 genes que codificam proteínas recém descobertas, 40 pseudogenes, mais de 70 genes que codificam RNAs e mais de 68 mil SNPs ([http://www.ensembl.org/Bos\\_taurus/index.html](http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html)).

Segundo Schuster & Cruz (2004) a existência de dois QTL dentro de um mesmo grupo de ligação pode alterar a estimação dos seus efeitos e de suas posições, pois a análise de um único intervalo dentro do modelo passa a ser influenciada por aquele QTL não considerado. Além da redução no poder do teste, pode ocorrer também o aparecimento de QTL fantasmas, ou seja, a detecção de QTL, com efeito significativo, dentro de um intervalo em que o mesmo não ocorre em razão da presença de outros QTL em intervalos adjacentes. Para avaliar a real existência dos dois QTL foi realizada nova análise no GridQTL. Esse software permite a realização de análises visando à identificação de dois QTL dentro de um mesmo grupo de ligação. O valor de F encontrado quando se compara 2 QTL vs 0 QTL foi de 8,01, indicando a existência de QTL nesse cromossomo, porém, o F encontrado quando se

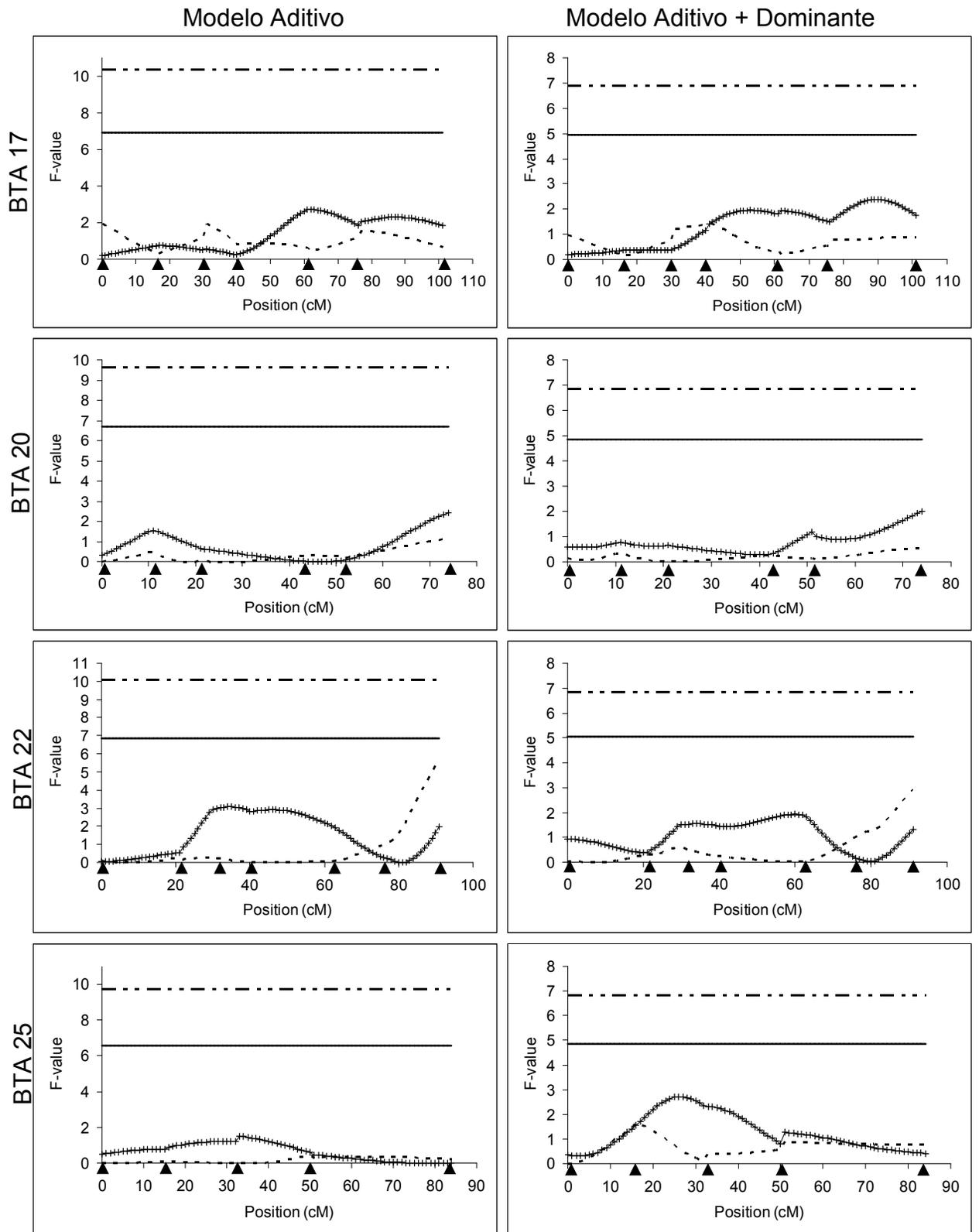
compara 2 QTL vs 1 QTL foi de 3,75, ou seja, é mais provável que exista apenas um QTL nesse cromossomo. Para certificar esses resultados é necessário saturar melhor esse cromossomo com a adição de novos marcadores e se possível a genotipagem de mais animais.

O QTL com maior valor de F detectado no presente trabalho encontra-se no BTA11 para a estação chuvosa. Nesse cromossomo foi possível também a identificação de outro QTL em região distinta na estação seca. O QTL detectado na estação chuvosa apresenta efeito aditivo com média de  $2,55 \pm 0,28$  em que o efeito aditivo causa uma alteração de  $0,39 \pm 0,09$  na média. Foi o QTL com maior contribuição no efeito fenotípico, sendo responsável por 5,02% da variação fenotípica da característica (Tabela 7). Esse QTL também foi identificado quando foi utilizado o modelo aditivo e dominante, porém, da mesma forma que ocorreu no BTA10, o efeito dominante não foi significativo. O QTL detectado na estação seca ( $P < 0,05$ ) apresenta um efeito fenotípico muito menor, contribuindo apenas com 2,28% da variação fenotípica da característica. A média para essa estação foi de  $1,57 \pm 0,29$  e o efeito aditivo contribuiu com um aumento de 0,24 na média. Esses dois QTL apresentaram efeito aditivo positivo logo, da mesma forma que os demais QTL detectados, o aumento no número de carrapatos por animal teve origem nos alelos herdados a partir dos touros holandeses. O BTA11 apresenta mais de 100 milhões de pares de bases em que já foram identificados 882 genes que codificam proteínas, 33 pseudogenes, mais de 180 genes que codificam diferentes formas de RNAs e mais de 60 mil SNPs. Já foram detectados cerca de 25 QTL (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/browse>) nesse cromossomo para diversas características como fertilidade, mastite e produção de leite entre outras (Holmberg & Andersson-Eklund, 2004 e 2006; Kucerova *et al.*, 2006)

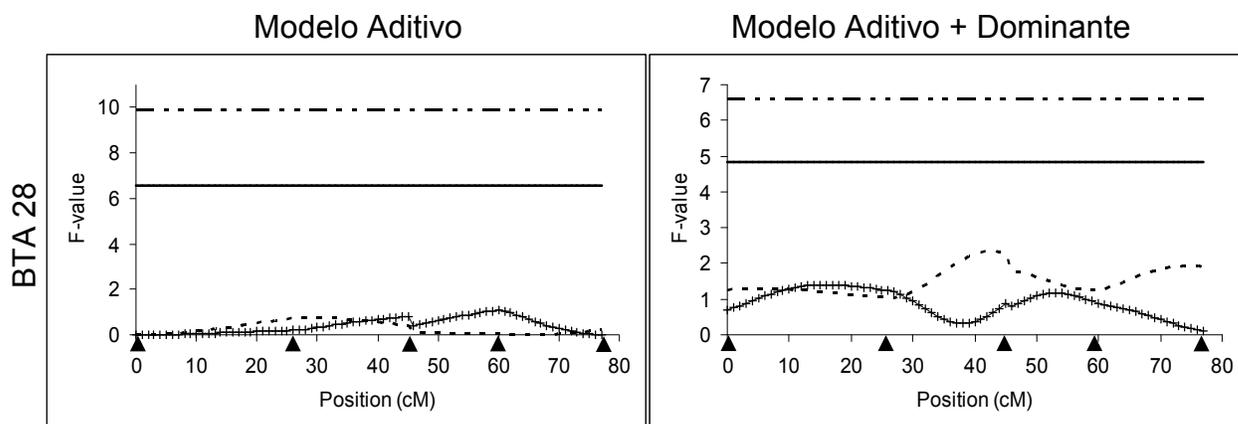
Para os demais cromossomos não foram detectados QTL para a resistência ao carrapato (Figuras de 1 a 5).



**Figura 3**– Valores de F para os cromossomos 11, 12, 15 e 16. As setas indicam a posição dos marcadores: — 5%, - - - 1%, ..... seca; - · - · - chuvosa.



**Figura 4**– Valores de F para os cromossomos 17, 20, 22 e 25. — 5%,  
 ■■■■■ 1%, .....seca, .....chuvosa.



**Figura 5** – Valores de F para o cromossomo 28. — 5%, ..... 1%,  
 ..... seca, ..... chuvosa.

**Tabela 6** – Resumo das análises de associação para os quatro cromossomos em que foram identificados QTL na estação seca indicando o valor de F encontrado, posição em que foi detectado o QTL, o intervalo de confiança (I.C.), o efeito aditivo e dominante de cada QTL e a porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL encontrado.

Cromossomos	Valor de F		Posição (cM)	I.C.- 95% (cM)	Efeito aditivo	Efeito dominante	%σ <sup>2fc</sup>
	A <sup>a</sup>	AD <sup>b</sup>					
2	5,4	6,9**	56	22	-0,19	-0,32	4,23
6	10,2*	5,3	0	7	0,24	--	3,17
10	12,2**	6,4*	19	70	0,33	0,19	3,81
11	7,2*	4,0	72	19	0,25	--	2,28

<sup>a</sup> Modelo aditivo; <sup>b</sup> Modelo aditivo+dominante; <sup>c</sup> Proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL; \*\* P<sub>cromossômico</sub> < 0,01; \* P<sub>cromossômico</sub> < 0,05

**Tabela 7** – Resumo das análises de associação para os dois cromossomos em que foram identificados QTL na estação chuvosa indicando o valor de F encontrado, posição em que foi detectado o QTL, o intervalo de confiança (I.C.), o efeito aditivo e dominante de cada QTL e a porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL encontrado.

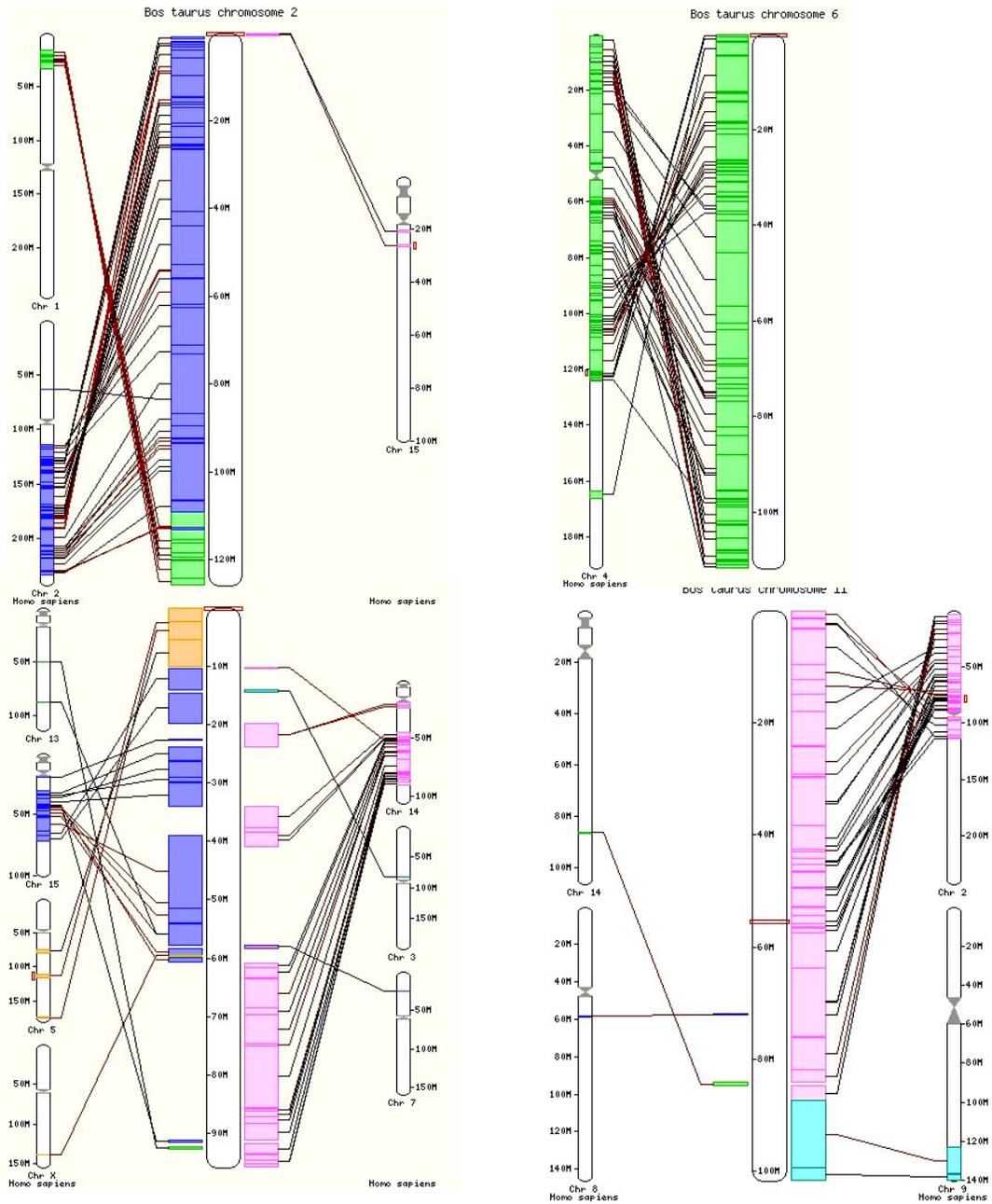
Cromossomos	Valor de F		Posição (cM)	I.C.-95% (cM)	Efeito aditivo	Efeito dominante	% $\sigma^{2fc}$
	A <sup>a</sup>	AD <sup>b</sup>					
6	9,3*	5,1	0	7	0,28		2,87
11	16,5**	8,6**	43	19	0,39	0,12	5,02

<sup>a</sup> Modelo aditivo; <sup>b</sup> Modelo aditivo+dominante; <sup>c</sup> Proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL; \*\*  $P_{\text{cromossômico}} < 0,01$ ; \*  $P_{\text{cromossômico}} < 0,05$

O mapeamento fino visando à inclusão de marcadores adicionais, nas regiões em que foram detectados os QTL para resistência ao carrapato, poderá aumentar o valor de F e diminuir o nível mínimo de significância para os QTL já detectados no presente trabalho além de diminuir o intervalo de confiança dos mesmos. Além disso, os cromossomos que apresentaram vários QTL devem ser saturados para comprovar a real existência de mais de um QTL e estimar os efeitos independentes de cada um. A existência de dois QTL, dentro de um mesmo grupo de ligação, com efeitos contrários pode subestimar os efeitos dos dois QTL, inviabilizando a identificação correta de cada um. O refinamento da posição em que 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.

O grande avanço das técnicas moleculares e das ferramentas computacionais permitiu o desenvolvimento de mapas comparativos entre diferentes espécies, por exemplo, os mapas comparativos gerados entre bovinos e humanos (Itoh *et al.*, 2005). Esses mapas estão cada vez mais

saturados de informações e, a cada novo gene descoberto, uma nova abordagem pode ser realizada baseada nos segmentos de sintonia conservada já estabelecida para quase todo o genoma bovino vs humano. Como os maiores avanços na parte científica são observados em camundongos e humanos, é possível aproveitar esse conhecimento a partir da comparação entre as regiões genômicas de sintonia conservada e expandi-los para outras espécies. Por exemplo, para os cromossomos em que foram detectados QTL nesse estudo é possível estabelecer qual a relação existente entre as mesmas e os cromossomos humanos. O cromossomo 6 apresenta regiões de sintonia conservada com o cromossomo 4 de humanos, dessa forma, é possível identificar as regiões em que os QTL foram localizados e buscar possíveis genes candidatos dentro dessas regiões. O BTA 10 apresenta regiões de sintonia conservada com os cromossomos 3, 5, 7, 13, 14, 15 e X de humanos. A maior parte do BTA11 apresenta regiões de sintonia conservada com o cromossomo 2 de humanos além de compartilhar pequenas regiões com os cromossomos humanos 8, 9 e 14 (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema representando as regiões de sintenia conservada entre os cromossomos 2, 6, 10 e 11 de bovinos comparados aos cromossomos humanos. Dados retirados do site: [http://www.ensembl.org/Bos\\_taurus/index.html](http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html).

Após a identificação precisa dos QTL, com um intervalo de confiança menor possível, é necessário verificar se esses QTL realmente existem em populações comerciais. Como os QTL foram detectados em populações experimentais, e a aplicação desse conhecimento se dará em populações comerciais, é preciso certificar de que esses QTL segregam e em qual frequência os mesmos se encontram dentro dos rebanhos comerciais. 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.

## 5. CONCLUSÕES

- É possível afirmar que existem componentes genéticos responsáveis pela resistência/suscetibilidade ao carrapato além dos efeitos de ambiente e de suas interações.
- Foram identificadas respostas diferenciadas entre a estação seca e a estação chuvosa, evidenciando a presença de fatores genéticos distintos entre as duas estações.
- Os resultados obtidos utilizando o modelo aditivo foram diferentes quando comparados aos resultados obtidos com o modelo aditivo + dominante
- Foram identificados QTL em quatro cromossomos distintos, sendo que apenas um QTL foi detectado nas duas estações avaliadas. Os demais QTL identificados foram detectados em apenas uma das estações.
- Como foi um trabalho de varredura inicial, o intervalo de confiança no qual os QTL foram identificados é relativamente grande. Dessa forma, após a identificação dos QTL é necessário a realização do mapeamento fino para posterior busca de genes candidatos dentro das regiões identificadas e assim identificar a real relação entre os QTL e a resistência a carrapatos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATEPAULO A. R. R.; CAETANO, A. R. C.; MENDES JR, T.; CARVALHO, W. A.; FERREIRA, B. R.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. F. Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* **Animal Genetics** 39, 328–332, 2008.
- ANDRADE, A.B.F.; SILVA, R.G.; COSTA, A.J. et al. Genetic and Environmental aspects of the resistance of zebu cattle to the tick *Boophilus microplus*. In: **World Congress On Genetics Applied To Livestock Production** 6. Armidale. 27, 339-342, 1998.
- ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; SONSTEGARD, T.S.; TASSELL, C.V. DA, Y.; VANRADEN, P. M.; RON, M.; WELLER, J. I.; LEWIN, H. A. Detection of quantitative trait loci affecting 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. Molecular markers in animal genetics improvement. **Biotechnology** 5, 573-576, 1987.
- 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.
- 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.

- 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 7<sup>th</sup> 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.
- BROOKES, A. J. The essence Of SNPs. **Gene** 234, 177-186, 1999.
- CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellites markers. **American Journal of Human Genetics** n.52, p.922-927, 1993.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics** 138, 963-971, 1994.
- EDWARDS, C. J.; MACHUGH, D. E. DOBNEY, K. M.; MARTIN, L.; RUSSELL, N.; HORWITZ, L. K.; MCINTOSH, S. K.; MACDONALD, K. C.; HELMER, D.; TRESSET, A.; VIGNE, J. D.; BRADLEY, D. G. Ancient DNA analysis of 101 cattle remains: limits and prospects. **Journal of Archaeological Science** 31, 695-710, 2004.
- 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.
- ENGEL, S.R.; LINN, R.A.; TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy** 77, 504-518, 1996.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman Group, London, 1996.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. EMBRAPA/CENARGEN, 220p, 1996.
- 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.
- FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; Análise de Fatores Genéticos e Ambientais que Afetam a Infestação de Fêmeas Bovinas da Raça Caracu por Carrapatos (*Boophilus microplus*) **Revista Brasileira Zootecnia** 32, 1578-1586, 2003

- FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology** 29, 57-71, 1999.
- FRISCH, J. E.; O'NEILL, C. J.; KELLY, M. J. Using genetics to control cattle parasites - the Rockhampton experience. **International Journal Parasitology** 30: 253-264, 2000.
- FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil.. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, 8, 49-61, 1993
- GAUGHAN, J.B., MADER, T.L., HOLT, S.M., JOSEY, M.J., ROWAN, K.J., Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **Journal Animal Science** 77, 2398–2405, 1999.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics** 46, 319-330, 1975
- GONZALES, J.C. O controle dos carrapatos dos bovinos. Porto Alegre: **Sulina** 104, 1975
- GREEN, P., K. FALLS, AND S. CROOK. 1990. Documentation for CRIMAP. version 2.4. Washington Univ. School of Medicine, St. Louis, MO.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P. SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biology** 39, 439-446, 1974.
- HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity** 69, 315–324, 1992.
- HALEY, C. S.; KNOTT, S.A.; ELSEN, J. M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics** 136,1195–1207, 1994.
- 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, A.C., OLSON, T.A., CHASE JR., C.C., BOWERS, E.J., RANDEL, R.D., MURPHY, C.N., VOGT, D.W., TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **Journal Animal Science** 74, 295–303, 1996.
- 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.
- HILLEL, J.; DUNNINGTON, E. A.; SIEGEL, P. B. DNA markers in poultry breeding and genetic analyses. **Poultry Science Review** 4, 169-186, 1992.

- HOLMBERG, M.; ANDERSSON-EKLUND, L. Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 87, 2653-2659, 2004.
- HOLMBERG, M.; ANDERSSON-EKLUND, L. Quantitative Trait Loci Affecting Fertility and Calving Traits in Swedish Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science** 89, 3664-3671, 2006
- 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.
- ITOH, T.; WATANABE, T.; IHARA, N.; MARIANI, P.; BEATTIE, C. W.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. **Genomics** 85, 413–24, 2005.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology** 129, 3-14, 2004.
- JONGEJAN, F.; NENE, V.; FUENTE, J. D. F.; PAIN, A.; WILLADSEN, P. ADVANCES IN THE GENOMICS OF TICKS AND TICK-BORNE PATHOGENS. **Parasitology** 23, 391-396, 2007.
- KEARSEY MJ. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). **Journal of Experimental Botany** 49, 1619-1623, 1998.
- 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.
- KUCEROVA, J.; LUND, M. S.; SORENSEN, P.; SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; NIELSEN, V. H.; THOMSEN, B.; BENDIXEN, C. Multitrait quantitative trait Loci mapping for milk production traits in Danish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science** 89, 2245-2256, 2006.
- 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.; BREINIG, 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.
- LIU, B. Computational tools for study of complex traits. In: **Molecular Dissection of Complex Traits**, 1998.
- LYNCH, M.; WALSH, B; **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA., 1998.

- LOFTUS, R.T.; MacHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G. Sharp, P. M. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of National Academy of Science** 91, 2757-2761, 1994.
- MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L., Acelerando o melhoramento com o mapeamento do genoma bovino. **Informe Agropecuário** 22, 98-104, 2001
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, 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.
- MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; Nascimento, C.S.; Silva, M.V.G.B.; Teodoro, R.L.; Furlong, J.; Prata, M.C.A.; Campos, A.L.; Guimarães, M.F.M.; Azevedo, A.L.S.; Pires, M.F.A.; Verneque, R.S. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics and Molecular Research** 5, 513–524, 2006.
- MULLIS, K.B. FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology** 155, 335-350, 1987.
- MURREL, A. E.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae)". **Systematic Parasitology** 56, 169-172, 2003.
- O'KELLY, J.C.; SEIFERT, G.W. The effect 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.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandes-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 42, 127-135, 1990.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II Infestação Natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 24, 1267-1271, 1989.
- OLSEN, W. O. **Parasites, Their Life Cycles and Ecology** (3<sup>rd</sup> edition). University Park Place, Baltimore. 1974.
- OLSEN, H. G.; LIEN, S.; SVENDSEN, M.; NILSEN, H.; ROSETH, A.; AASLAND, OPSAL M.; MEUWISSEN, T. H. Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. **Journal of Dairy Science** 87, 690-8, 2004.
- OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics** 51, 283-290, 1992.

- PÉREZ-ENCISO, M.; CLOP, A.; NOGUERA, J. L.; OVILO, C.; COLL, A.; FOLCH, J.M.; BABOT, D.; ESTANY, J.; OLIVER, M. A.; DIAZ, I.; SANCHEZ, A. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from an Iberian by Landrace intercross. **Journal of Animal Science** 78, 2525–2531, 2000.
- POWELL, R.T. e REID, T.J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**, Brisbane, 108, 279-300, 1982.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. **Australian Journal of Agricultural Research** 8, 215–223, 1957.
- ROBERTS, J. A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Journal Parasitology** 54, 657-662, 1968.
- 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.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology** 129, 389-403, 2004.
- SCHOLTZ MM, SPICKETT AM, LOMBARD PE, ENSLIN CB. THE EFFECT OF TICK INFESTATION ON THE PRODUCTIVITY OF COWS OF THREE BREEDS OF CATTLE. **Journal Veterinary Research**. 58, 71-74, 1991.
- 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 Congress on Genetics Applied to Livestock Production** CD-ROM no. 09-19, 2002.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. Estatística genômica - aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Viçosa: UFV, 2004. 568p.
- 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.
- SEATON, G.; HERNANDEZ, J.; GRUNCHEC, J. A.; WHITE, I.; ALLEN, J.; DE KONING, D. J.; WEI, W.; BERRY, D.; HALEY, C.; KNOTT, S. GridQTL: A grid portal for QTL mapping of compute intensive datasets. **Proc. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2006.
- 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
- SICK, H. Ornitologia Brasileira, 1ª ed., Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 917 p. 1997.
- SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo. Nobel. 2000a. 286p.

- 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.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nuclei Acids Research** 17, 6563-6571, 1989.
- 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 43<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2006.
- TEODORO, R. L.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; VERNEQUE, R. S. Resistência Bovina ao Carrapato *Boophilus Microplus*: Experiência Brasileira. In: **Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. (Org.). Anais do 5<sup>o</sup> Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga**: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004, v. CDROM, p.
- 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.
- VERÍSSIMO, C.J. **Resistência e susceptibilidade de bovinos mestiços ao carrapato *Boophilus microplus*** Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.
- 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 33<sup>th</sup> 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.
- WAGLAND B M. Host resistance to cattle tick *Boophilus microplus* in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. **Australian Journal of Agricultural Research** 26,1073-1080, 1975.
- WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics** 7: 524–530, 1990.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology** 110, 43–50, 1995.

WINTERO, A. K.; FREDHOLD, M.; THOMSEN, P. B. Variable (dG-dT)<sub>n</sub>(dC-dA)<sub>n</sub> sequences in the porcine genome. **Genomics** 12, 281-288, 1992.

# 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](#)