

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA CARACTERÍSTICAS DE
CRESCIMENTO E DE RESISTÊNCIA NO CROMOSSOMO 14 DE
BOVINOS F2 PROVENIENTES DE UM CRUZAMENTO GIR X
HOLANDÊS**

MARCELO MIYATA

São Carlos - SP

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA CARACTERÍSTICAS DE
CRESCIMENTO E DE RESISTÊNCIA NO CROMOSSOMO 14 DE
BOVINOS F2 PROVENIENTES DE UM CRUZAMENTO GIR X
HOLANDÊS**

MARCELO MIYATA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

(Campo de pesquisa: Melhoramento Genético Animal)

São Carlos - SP

2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M685mq

Miyata, Marcelo.

Mapeamento de QTLs para características de crescimento e de resistência no cromossomo 14 de bovinos F2 provenientes de um cruzamento Gir x Holandês / Marcelo Miyata. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
61 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Genética animal. 2. BTA14. 3. QTL. 4. Bovino. 5. Microsatélites. I. Título.

CDD: 591.15 (20ª)

Orientadora

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

"Somos uma terrível mistura de ácidos nucléicos e lembranças, de desejos e de proteínas.

O século que termina ocupou-se muito de ácidos nucléicos e de proteínas.

O seguinte vai concentrar-se sobre as lembranças e os desejos.

Saberá ele resolver essas questões?"

O Ratinho, a Mosca e o Homem

François Jacob

Dedicatória

Agradeço a Deus, ao “Seu Zé”, aos meus pais Roberto e Nadir, à minha irmã Simone e à Erika, por todo o apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida. Passamos por momentos difíceis, mas superamos tudo isso com a nossa união.

Dedico este trabalho a vocês que moram em meu coração.

Obrigado

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano pela orientação, paciência e apoio.

Aos meus pais, Roberto e Nadir, por acreditar em mim sempre e por saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

À minha irmã Simone, pela amizade, pelo carinho e pelo apoio também.

À Erika pelo amor, amizade, carinho, compreensão, paciência... enfim, tudo.

À CNPQ pelo apoio financeiro para a realização do trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Gustavo, Liliane, Gisele, Rogério, João, Adriana e Sarah pela ajuda, companheirismo e pelas risadas.

Ao técnico do laboratório, Gilberto "Giba" pela ajuda e por me agüentar todo esse tempo.

Ao Dr. Marcos Vinicius G. Barbosa da Silva pela ajuda na parte estatística.

Ao Ms. Waldomiro Barioni Júnior pela ajuda com o SAS.

Ao Ms. Millor pela ajuda na construção do mapa de ligação, sua ajuda foi uma das etapas mais importantes neste trabalho.

Aos pesquisadores Tad Sonstegard, Sabrina Machado e Sérgio Mattioli pela doação de primers e também ao Dr. Sonstegard pelas correções no artigo.

Resumo

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e a bovinocultura representa cerca de 43% do PIB agropecuário do Brasil, onde o cruzamento das espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* permite a combinação de características de produção da primeira espécie e a rusticidade da segunda espécie visando o melhoramento genético dos bovinos. Devido à essa importância econômica da pecuária no Brasil, a procura por regiões no genoma que contribuem para características de produção é objeto de muitos estudos, que incluem características como rendimento de carne, precocidade de crescimento e diversos tipos de pesos. Também importante é o combate aos endoparasitas e ectoparasitas, que têm grande relevância econômica, uma vez que as perdas de crescimento e de produção (carne e leite) afetam o rebanho bovino e conseqüentemente, o produtor e consumidor. O objetivo deste trabalho foi mapear QTLs (Quantitative Trait Loci) para características de crescimento e de resistência (a ectoparasitas e endoparasitas) por meio da varredura do cromossomo 14 dos bovinos (BTA14), utilizando marcadores microssatélites em uma população F2 Holandês x Gir. O mapeamento de QTLs relacionados à característica peso ao nascimento (PN), permitiu encontrar um QTL sugestivo ($P < 0,05$) a 1 cM do centrômero e para a característica peso aos 60 dias (P60), permitiu encontrar um QTL sugestivo ($P < 0,05$) a 0 cM do centrômero. O mapeamento para característica de resistência ao ectoparasita *Boophilus microplus* revelou um QTL significativo ($P < 0,01$) a 22 cM do centrômero e à resistência a endoparasitas nenhum QTL foi associado. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que é possível mapear regiões do genoma dos bovinos que afetam características quantitativas, como crescimento e resistência à parasitas, através da utilização de marcadores microssatélites.

Abstract

Brazil possesses the largest commercial bovine herd in the world and cattle represents about 43% of agricultural PIB of Brazil. Crossing *Bos taurus* and *Bos indicus* species allows the combination of traits of production from the first specie and of rusticity from the second specie for the genetic improvement of the bovines. Due to the economical relevance of livestock in Brazil, the search for regions in the genome that contribute to production traits is object of many studies including traits such as meat yield, precocity of growth and many weight measures (eg. birth weight, yearling weight). The endoparasites and ectoparasites have great economical relevance, once the growth losses and production (meat and milk) affect the bovine herd and consequently, the producer and consumer. The objective of this work was to map QTL (Quantitative Trait Loci) for growth traits and for resistance to ectoparasite and endoparasites through the BTA14 scan, using microsatellite markers in a F2 population Holstein x Gyr. The QTL mapping for the trait birth weight (BW) suggested a QTL ($P < 0.05$) at 1 cM from centromere and for the weight at 60 days (P60), a suggestive QTL ($P < 0.05$) was found at 0 cM from centromere. The mapping for resistance to the ectoparasite *Boophilus microplus* revealed a significant QTL ($P < 0.01$) at 22 cM from centromere but no association was observed for endoparasites. Together, the results found in this work suggest the possibility to map regions of the bovine genome that affect quantitative traits, like growth and resistance, by means of microsatellite markers.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 - Cruzamentos realizados para a obtenção da geração F1.....	30
Figura 2 - Cruzamentos realizados para a obtenção da geração F2.....	31
Figura 3 - Sete marcadores moleculares dispostos ao longo do BTA14.....	34
Figura 4 - Distribuição da estatística F para peso ao nascimento e peso aos 60 dias.....	44
Figura 5 - Distribuição da estatística F para contagem de carrapatos no BTA14.....	47
Figura 6 - Distribuição da estatística F para contagem de ovos por grama de fezes no BTA14.....	50

Lista de Tabelas

página

Tabela 1 - Os sete marcadores escolhidos com as respectivas temperaturas de anelamento e fluorescência.....	35
Tabela 2 - Sete marcadores microssatélites utilizados, com suas respectivas porcentagens de animais genotipados por geração.....	39
Tabela 3 - Os marcadores escolhidos com os números de alelos, sua heterozigosidade e valores de PIC.....	40
Tabela 4 - Tabela ilustrando médias e desvio padrão para a característica contagem de carrapatos incluindo média geral do número de carrapatos, média do número de carrapatos nos machos e média do número de carrapatos nas fêmeas.....	41
Tabela 5 - Tabela ilustrando média estimada e desvio padrão para a característica contagem de ovos por grama de fezes.....	41
Tabela 6 - Comparação entre o número de meioses informativas do mapa EMBRAPA e do mapa MARC para cada marcador.....	41
Tabela 7 - Mapa de ligação com as taxas de recombinação dos marcadores e sua posição relativa no mapa.....	42
Tabela 8 - Comparação das distâncias no mapa de ligação do cromossomo 14 entre o mapa referência MARC e o mapa obtido pela EMBRAPA.....	43

Sumário

	página
1 – Introdução.....	13
1.1 - Os bovinos.....	13
1.2 - Marcadores moleculares.....	14
1.3 - Mapeamento de QTLs.....	15
1.4- Características de crescimento.....	17
1.5- Os endoparasitas <i>Haemonchus</i> , <i>Cooperia</i> e <i>Ostertagia</i>	18
1.6 - O ectoparasita <i>Boophilus microplus</i>	21
1.7 - <i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i>	23
1.8 - QTLs do cromossomo 14.....	24
2 - Hipótese e Objetivos.....	28
3 - Material e Métodos.....	30
3.1 - População experimental.....	30
3.2 - Coleta de sangue e extração de DNA.....	31
3.3 - Coleta dos dados fenotípicos.....	32
3.4 - Marcadores moleculares.....	33
3.5 - Reações em cadeia da polimerase.....	34
3.6 - Análise dos produtos de PCR.....	35
3.7 - Mapa de ligação.....	35
3.8 - Mapeamento de QTLs.....	36
4 - Resultados e Discussão.....	39
4.1 - Marcadores microssatélites.....	39
4.2 - Características fenotípicas.....	40
4.3 - Mapa de ligação.....	41
4.4 - Mapeamento de QTLs para características de crescimento.....	43
4.5 - Mapeamento para característica de resistência a ectoparasitas e endoparasitas.....	47
5 - Conclusão.....	53
6 - Referências Bibliográficas.....	55

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

1.1 – Os bovinos

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 183 milhões de cabeças, sendo aproximadamente 76% para a produção de carne e 24% para a produção de leite. Dentro do PIB agropecuário do Brasil, a bovinocultura representa cerca de 43%, mostrando a sua importância econômica e social para o país (Martinez *et al.*, 2004). Os bovinos domésticos pertencem ao gênero *Bos*, onde a espécie *Bos indicus* é composta pelos bovinos com cupim denominados de zebuínos ou indianos, provenientes da Ásia e África, e a espécie *Bos taurus* é representada pelos bovinos sem cupim, denominados de europeus. Essas duas espécies podem reproduzir entre si sem afetar a sua fertilidade, permitindo, sob o ponto de vista do melhoramento genético, a combinação de características de produção da segunda e a rusticidade da primeira (Tambasco, 1998).

A raça Gir, representante da espécie *Bos indicus*, foi um dos principais grupamentos zebuínos trazidos para o Brasil (Faria *et al.*, 2001), sendo introduzida por volta de 1906 (Santiago, 1986). No seu país de origem é muito utilizada para produção de leite (Faria *et al.*, 2001). No início de sua exploração no Brasil, a raça Gir foi bastante utilizada para corte e atualmente ela é a preferida para cruzamentos leiteiros, principalmente com a raça Holandesa. Caracteriza-se por um perfil convexo e ultra-convexo, testa proeminente, chifres laterais frequentemente retorcidos, barbela desenvolvida e pelagens variadas, podendo apresentar pêlos brancos, vermelhos, amarelos e pretos em várias combinações (Ledic, 2000). Segundo dados da Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ), o Gir Leiteiro apresenta menores infestações de ecto e endoparasitas e menores incidências de doenças do que as raças de clima temperado, acarretando um menor uso de carrapaticidas, vermífugos e antibióticos, proporcionando um produto com menor quantidade de resíduos.

A raça Holandesa é representante da espécie *Bos taurus* e sua origem é pouco conhecida, com relatos indicando sua existência há 2.000 anos nas terras planas e pantanosas da Holanda setentrional e da Frísia (Países Baixos) e também na Frísia Oriental (Alemanha). No Brasil não foi estabelecida uma data de introdução

da raça holandesa, e Paulino Cavalcanti (1935), citado pela ABCZ, menciona que "segundo os dados históricos, referentes à nossa colonização, presume-se que o gado holandês foi trazido nos anos de 1530 a 1535, período no qual o Brasil foi dividido em capitanias hereditárias". Os animais da raça Holandesa são geralmente malhados de preto-branco ou vermelho-branco, com cabeça bem moldada, fronte ampla e moderadamente côncava, e pele fina e pregueada com pêlos finos. São animais altamente especializados para a produção de leite, mas requerem boas condições de clima e temperatura. Por se tratar de uma raça originária de países de clima frio, onde são altamente produtivos, os animais europeus tem seu desempenho reduzido quando criados em condições tropicais, onde a falta de adaptação ao calor, às radiações, à umidade, à seca, à má qualidade das forragens e às doenças infecciosas e parasitárias, prejudica sua produtividade no Brasil (Marques, 1976).

Apesar da importância histórica das primeiras importações dos animais da raça Holandesa, essas importações pouco contribuíram para a constituição dos rebanhos atuais, que se formaram a partir de importações mais recentes. Além disso, uma vez que na reprodução da raça Holandesa utiliza-se intensivamente a inseminação artificial, o intercâmbio de material genético entre os diversos países tem sido constante.

1.2– Marcadores moleculares

A variação genética existente para resistência a parasitas sugere a utilização de marcadores moleculares associados à resistência como um auxílio nos programas de melhoramento, visando a obtenção de animais economicamente mais produtivos. Dentre as técnicas mais conhecidas podem ser citadas os polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD), polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e marcadores baseados na seqüência de DNA repetitivo, como os minissatélites e microssatélites.

O polimorfismo dos marcadores microssatélites baseia-se na variação do número de repetições, que é resultado de erros durante a replicação do DNA pela DNA polimerase. A utilização de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a análise desses marcadores foi importante para a redução no tempo na identificação

dos genótipos, tornando os marcadores microssatélites bastante adequados para a construção de mapas genéticos e identificação de QTLs (Massey & Georges, 1992). Atualmente umas das ferramentas utilizadas na exploração das informações a respeito da resistência genética a parasitas é a seleção assistida por marcadores (MAS). Como grande parte das características de interesse econômico possui um perfil quantitativo, a MAS torna-se uma opção atraente, pois pode levar a resultados com bons ganhos genéticos mais rapidamente do que quando comparado às técnicas de melhoramento tradicionais (Khatkar *et al.*, 2004).

1.3 – Mapeamento de QTLs (Quantitative Trait Loci)

Uma característica é denominada de quantitativa quando apresenta uma distribuição contínua, podendo ser controlada por muitos genes, onde cada gene, em conjunto com o ambiente, produz efeitos pequenos sobre a característica. Através de estudos envolvendo mapeamento genômico, chegou-se à conclusão de que alguns genes são responsáveis por parte da variação de uma característica quantitativa, e que os *loci* que controlam estas características quantitativas são denominados de QTLs. Os métodos para a procura e caracterização desses QTLs são chamados de mapeamento de QTLs (Liu, 1998). Para que seja possível o mapeamento de QTL, envolvendo a sua detecção, localização e estimativa do seu efeito, um número grande de animais é necessário, com seus respectivos fenótipos e genótipos de interesse determinados, que é inversamente proporcional ao efeito que se deseja identificar, da herdabilidade da característica e dependente do delineamento experimental escolhido para o estudo. Nos bovinos, devido aos custos de produção e manutenção geralmente bastante elevados, esse número é particularmente limitante (Regitano, 2004).

As características quantitativas são então controladas por poligenes, por exemplo, as doenças, que resultam em complexas interações alélicas e não alélicas e também são influenciadas pelo ambiente (Regitano, 2004), podendo ser chamadas de multifatoriais, tornando seu estudo bastante complexo. O desenvolvimento de marcadores para identificar e estimar o efeito de um poligene é baseado em duas estratégias. A primeira estratégia de identificação de QTL é baseada na detecção de

polimorfismos em genes que estão diretamente relacionados com a característica de produção, chamados de genes candidatos.

A segunda estratégia utiliza marcadores aleatórios para a construção de mapas genéticos saturados, onde os intervalos delimitados por estes marcadores são avaliados em relação às características de interesse econômico e utilizados na identificação de *loci* que afetem características quantitativas (Geldermann, 1975). A vantagem deste procedimento é que não é necessário o conhecimento prévio de genes envolvidos na expressão do fenótipo de interesse, podendo revelar regiões no genoma que não estariam associados a genes candidatos, devido à ação pleiotrópica dos genes que não se encontram diretamente relacionados a processos fisiológicos e/ou morfológicos (Rocha *et al.*, 2002).

O sucesso dessa estratégia depende da construção de mapas de ligação, com marcadores dispostos em intervalos de 20 cM. A construção de tais mapas foi possível com a utilização de marcadores que exploram o polimorfismo dos microssatélites (Soller, 1990). Em bovinos, os mapas genéticos publicados por Bishop *et al.* (1994), Barendse *et al.* (1994), Barendse *et al.* (1997) e Kappes *et al.* (1997) fornecem uma cobertura de 95% a uma distância média entre os marcadores inferior a 2,5 cM. Ihara *et al.* (2004) desenvolveram um mapa genético do genoma bovino baseado em 3802 microssatélites com potencial de resolução genética de 0,8 cM com 95% de confiança.

A determinação de ligação genética entre os alelos no *locus* marcador e os alelos do QTL depende da existência de desequilíbrio de ligação entre eles. Esse desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados e estimados através de análise estatística. Em alguns tipos de organismos, gerar esse desequilíbrio de ligação é possível cruzando-se linhagens endogâmicas, geneticamente divergentes, e fenotipicamente extremas em relação às características de interesse. Assim, obtêm-se indivíduos F1 heterozigotos para ambos os *loci*, e o cruzamento de indivíduos F1 gera progênie F2 (Machado, 2002).

Em bovinos, como a utilização de linhagens isogênicas não é possível, delineamentos experimentais que se aproximam do conceito de F2 são utilizados, gerando o desequilíbrio de ligação necessário para a identificação do QTL e a segregação, tanto do marcador quanto do QTL. Esse tipo de delineamento é usado quando duas populações divergentes são cruzadas e a frequência dos seus alelos é diferente, buscando reunir as melhores características de cada população, com a

possível separação dos efeitos aditivos e de dominância dos QTLs encontrados (Tunin, 2004).

Apesar das dificuldades observadas no mapeamento de QTLs em ruminantes, várias características já tiveram parte de sua variação atribuída a regiões do genoma dos bovinos. No cromossomo 14 dos bovinos (BTA14) alguns estudos já relataram a presença de QTLs para diferentes características.

1.4 – Características de crescimento

Existem vários estudos feitos com base em dados de crescimento de diversas populações, onde um dos objetivos é encontrar QTLs (Quantitative Trait Loci) ou polimorfismos de genes que estejam associados a estas características de crescimento nos cromossomos bovinos. Dentre estas características destacam-se: o estudo de diversos tipos de pesos, como peso ao nascimento, peso aos 60 dias, peso à desmama, peso ao sobreano, peso de carcaça, entre outras; e estudo de polimorfismos de genes relacionados a crescimento, como por exemplo o gene *igf-1* localizado no cromossomo 5 dos bovinos e o gene *pit1* localizado no cromossomo 1.

Alguns estudos de QTLs com peso ao nascimento relatam a presença de um QTL no cromossomo 5 (BTA5), onde Gasparin *et al.* (2005) em um estudo realizado utilizando a mesma população deste trabalho, encontraram um QTL significativo ($P < 0,01$) a 60 cM do marcador mais centromérico e Machado *et al.* (2003) utilizando uma população de bovinos Canchim, relataram a presença de um QTL a 82,9 cM do marcador mais centromérico. Embora o QTL encontrado por Machado *et al.* (2003) esteja próximo ao gene *igf-1* (*insuline growth factor 1*), sua associação com a característica peso ao nascimento foi refutada por Li *et al.* (2004), que não encontraram SNPs (Single nucleotide Polimorphisms) no *igf-1* que fossem os responsáveis por afetar as características peso ao nascimento, ganho médio diário pré-desmama e ganho médio diário em confinamento. Ainda no BTA5, Casas *et al.* (2003) estudando uma família de meio-irmãos resultante do cruzamento entre touro Brahman X Hereford e vacas *Bos taurus*, encontraram um QTL significativo para peso ao nascimento no cromossomo 5 entre 50 e 73 cM do início do grupo de ligação.

Kneeland *et al.* (2004), no estudo de uma linha comercial de *Bos taurus* utilizando haplótipos para mapear e identificar QTLs, estudaram 16 haplótipos que cobriam 13 regiões nos cromossomos bovinos. Esses haplótipos compreendiam duas regiões no BTA2 (de 9,1 a 22,5 cM e 95,0 a 100,3 cM) associadas a peso ao nascimento e ganho médio diário pós-desmama sob confinamento, três regiões no BTA6 (8,2 a 11,0 cM, 35,5 a 49,7 cM e 83,0 a 86,2 cM) associadas a peso ao nascimento, ganho médio diário pré-desmama e ganho médio diário pós-desmama sob confinamento, três regiões no BTA14 (26,0 a 26,7 cM, 36,2 a 46,2 cM e 52,0 a 67,7 cM) associadas a peso ao nascimento, ganho médio diário pré-desmama e ganho médio diário pós-desmama sob confinamento, uma região no BTA19 (52,0 a 52,7 cM) associada a peso ao nascimento, duas regiões no BTA21 (9,9 a 20,4 cM e 28,2 a 46,1 cM) associadas a peso ao nascimento e duas regiões no BTA23 (23,9 a 36,0 e 45,1 a 50,9 cM) associadas a peso ao nascimento.

1.5– Os endoparasitas *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia*

Os nematóides mais comuns nas regiões tropicais brasileiras são os dos gêneros *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia*. O nematóide gastrointestinal *Haemonchus contortus* causa muitas perdas de produção e sua importância econômica é grande. Para fins de comparação, o custo dos endoparasitas para a indústria americana em perdas de produtividade dos bovinos é estimado em dois bilhões de dólares ao ano (Sonstegard *et al.*, 2001). O nematóide *Haemonchus* parasita o tubo gastrointestinal onde tanto as larvas como as formas adultas se alimentam de sangue no estômago. O nematóide do gênero *Cooperia* infecta os hospedeiros no intestino delgado e suas espécies são amplamente distribuídas ao redor do mundo, onde a espécie *Cooperia punctata* é o nematóide mais comum em áreas temperadas e subtropicais. O nematóide do gênero *Ostertagia* habita o abomaso dos bovinos e destaca-se pelo fato de um fenômeno denominado de hipobiose, que é a capacidade de inibir o seu desenvolvimento durante o período de 3 a 5 meses como um mecanismo de defesa em situações menos favoráveis.

A presença das larvas destes nematóides nas pastagens está diretamente relacionada com os fatores ambientais, pois a umidade, chuva, pastos escassos e

pobres, solos compactos e também animais com deficiência alimentar favorecem o desenvolvimento e sobrevivência das larvas.

O método mais comum de combate aos endoparasitas é o uso de drogas anti-helmínticas, que apesar de serem eficazes e seguras (Sonstegard *et al.*, 2001), são utilizadas de forma oportunista ou diagnóstica pelos produtores (Furlong, 1996). Com isso, devido à sua heterogeneidade, as populações desses nematóides são capazes de desenvolver resistência em relação aos produtos quimioterapêuticos (Grant, 1994; Roos *et al.* 1994; Roos, 1997; Anderson *et al.* 1998) e essa resistência tem sido documentada em ovinos na Nova Zelândia (Vermunt *et al.*, 1995; Hosking *et al.*, 1996), Grã-Bretanha (Stafford and Coles, 1999), Argentina (Fiel *et al.*, 2001) e em outros países (Waller, 1994; Van Wyk *et al.*, 1999). No Brasil, Echevarria *et al.* (1996) ao estudarem a resistência dos nematóides aos anti-helmínticos, encontraram altos níveis de resistência para alguns grupos de anti-helmínticos em uma população de ovinos no Rio Grande do Sul. Farias *et al.* (1997) encontraram as espécies *Trichostrongylus*, *Ostertagia* e *Haemonchus* resistentes aos anti-helmínticos do grupo benzimidazol e levamisol, enquanto o grupo ivermectina foi considerado o composto mais efetivo no combate aos endoparasitas.

Além dos problemas ambientais causados pelos anti-helmínticos com os resíduos deixados no ambiente e a resistência dos endoparasitas, a conscientização dos consumidores através da procura de produtos de origem animal com pouca ou nenhuma quantidade de resíduos químicos, faz com que outras estratégias sejam adotadas ou aliadas ao método tradicional de combate. Uma forma alternativa de combate são os programas de controle de pastagens, que são complexos de operacionalizar e alguns sistemas não permitem a sua utilização adequada (Sonstegard *et al.*, 2001). Outra forma alternativa, com resultados promissores “in vitro”, é o uso de fungos nematófagos agindo como controladores biológicos, passando através do trato gastrointestinal dos bovinos, onde agem destruindo as larvas dos endoparasitas e reduzindo a transmissão de larvas infectantes (Gronvold *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1997).

O sistema imune também pode ser considerado como um método alternativo de combate aos endoparasitas, mas sua regulação ainda não está completamente elucidada. Logo após a infecção, o sistema imune dos bovinos é estimulado e reage aos endoparasitas, produzindo respostas imunológicas que vão desde a alteração morfológica do parasita até o impedimento do desenvolvimento das larvas

(Sonstegard *et al.*, 2001). Uma segunda estratégia utilizando o sistema imune é o uso de vacinas contendo imunopotenciadores, provocando a estimulação do sistema imune com a subsequente ação das citocinas (Sher & Coffman, 1992).

Apesar de todas as estratégias citadas acima terem potencial de combata à parasitose em bovinos, uma questão importante a ser levantada é se o sistema imunológico dos bovinos reage da mesma forma a todas as espécies de endoparasitas. Schmidt *et al.* (1998) ao analisar culturas fecais individuais de touros da raça Aberdeen Angus, não encontrou diferença significativa na resposta aos diversos gêneros de endoparasitas, indicando que a resposta aos endoparasitas é similar no hospedeiro (Sonstegard *et al.*, 2001). O tipo de resposta imunológica é dependente da constituição genética do hospedeiro, pois Kanobana *et al.*, (2001), ao estudar os tipos de resposta às infecções causadas pelo nematóide *Cooperia oncophora*, conseguiu distinguir três tipos de resposta: alta, intermediária e baixa. Para altas respostas, uma pequena proporção da população hospedeira mostra quase nenhum ovo, enquanto os animais de baixa resposta mostram alta quantidade de ovos, que continuam por semanas. No nível intermediário, a quantidade de ovos inicialmente é similar ao de baixa resposta, mas essa quantidade declina rapidamente após 28 a 35 dias após a infecção.

A utilização da genética dos bovinos pode ser útil na tentativa de minimizar a transmissão dos parasitas (Sher & Coffman, 1992). A genética do hospedeiro em relação a resistência aos endoparasitas já é utilizada em cruzamentos visando a seleção e o melhoramento de animais resistentes, com a finalidade de evitar prejuízos na produtividade e na qualidade dos produtos e evitar gastos referentes ao combate a estes parasitas. Esses cruzamentos são mais conhecidos em ovinos e têm sido bem sucedidos (Albers *et al.* 1987; Windom, 1991), já sendo aplicados comercialmente na Nova Zelândia (Morris *et al.* 2000). O maior empecilho para o desenvolvimento destes cruzamentos é o tempo necessário para se chegar a um nível satisfatório de resistência dos hospedeiros, podendo levar de 10 a 20 anos (Albers *et al.* 1987), ou seja, um período grande de tempo se comparado ao tempo necessário para o desenvolvimento de resistência dos endoparasitas em relação aos anti-helmínticos ou ao aparecimento de um novo tipo de anti-helmíntico.

Todas estas formas de combate visam diminuir as perdas econômicas causadas pelos endoparasitas, mas com o auxílio do sequenciamento de genomas dos animais domésticos e a identificação de genes e de proteínas, as pesquisas

ganharão ferramentas importantes para o entendimento do sistema imunológico sendo possível manipular os animais geneticamente, através de cruzamentos seletivos, de maneira segura para o consumidor, enquanto os efeitos ambientais são minimizados (Sonstegard *et al.*, 2001).

1.6 - O ectoparasita *Boophilus microplus*

Canestrini em 1887, descreveu o carrapato *Boophilus microplus*, que, de acordo com Evans *et al.* (2000), é um dos parasitas que mais prejudicam a bovinocultura no Brasil, sendo obrigado a passar uma fase de sua vida sobre o bovino, ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue. Segundo Hoogstraal (1985) a espécie *B. microplus* emergiu na Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes, adaptando-se ao clima tropical, onde as condições favoráveis, como calor e umidade, permitiram a sobrevivência e a manutenção da espécie (Powel & Reid, 1982).

Os prejuízos econômicos gerados pelo carrapato são grandes, pois as perdas em produtividade de leite e carne e mortalidade são estimadas em quase um bilhão de dólares ao ano no Brasil (Young & Morzaria, 1986), causando prejuízos que vão, desde a anemia até lesões no couro e transmissão de doenças (Gonzales, 1993). Essas perdas causadas pelo carrapato podem afetar os animais de tal maneira que, se não forem tratados, podem perder de 18 a 47 kg de peso por ano (Honer e Gomes, 1990) e podem até chegar à morte, se permanecerem infestados por mais de seis semanas com uma carga de mais de 200 carrapatos (Frisch *et al.*, 2000).

A principal estratégia usada no controle ou na erradicação do *B. microplus* é o uso de carrapaticidas. Mas, por deixarem resíduos químicos no ambiente e seu uso inadequado propiciar o desenvolvimento de resistência dos carrapatos aos carrapaticidas, várias alternativas de combate vêm sendo desenvolvidas em diversos centros de pesquisa do mundo (Pereira, 2000). Outras estratégias que são utilizadas é o uso da genética dos bovinos, selecionando aqueles que são naturalmente resistentes (Angus, 1996), uso de patógenos agindo como controle biológico e predadores de carrapatos (Samish & Rehaceck, 1999) e o desenvolvimento de vacinas (Willadsen & Jongejan, 1999).

A estratégia do desenvolvimento de vacinas é altamente efetiva no controle do carrapato. Estas vacinas são desenvolvidas contendo antígenos, que estimulam respostas no hospedeiro contra o carrapato (Rodriguez *et al.* 1995). A ativação do sistema imunológico dos bovinos por essas vacinas é feita através da proteína Bm86, que é extraída das células epiteliais do intestino do *B. microplus*, provocando a formação de anticorpos específicos contra essa proteína, que podem agir levando à morte dos carrapatos ou então causando lesões no intestino que reduzem a viabilidade dos carrapatos (Kemp *et al.*, 1989). Outra proteína antigênica isolada dos carrapatos, a Bm91, tem efeitos imunizadores, diminuindo a taxa de infestação nos bovinos, impedindo o ingurgitamento e postura de ovos das teleóginas. Conforme Willadsen *et al.* (1996), a combinação das vacinas contendo Bm86 e Bm91 tem efeitos significativamente maiores do que vacinas contendo apenas a proteína Bm86, que são as vacinas registradas comercialmente. Apesar de serem comercializadas desde 1994, o progresso no desenvolvimento de novas vacinas está lento. Porém um novo grupo de antígenos foi descoberto em uma combinação com os epítomos dos antígenos “expostos” contidos na saliva do carrapato e antígenos “ocultos” normalmente não apresentados ao hospedeiro, conferindo uma ação mais ampla dessa vacina, atuando nas diversas fases do ciclo de vida do carrapato (Nuttal *et al.* 2006).

Naturalmente existe uma diferença de resposta nos bovinos em relação ao efeito das vacinas, pois Glass (2004) observou efeitos significativos entre touros e entre raças em uma população de bovinos Charolês e Holandês, medindo a diferença nos níveis de células T e citocinas. Estes resultados sugerem que o entendimento das funções dos genes do MHC e de genes relacionados ao MHC pode contribuir muito para o desenvolvimento de vacinas mais específicas. Portanto, o uso das vacinas combinadas com a utilização de animais naturalmente resistentes ao carrapato será um modo mais eficiente de controle (Martinez *et al.*, 2004), e o projeto de sequenciamento do genoma do *B. microplus* permitirá o entendimento dos genes envolvidos na regeneração dos apêndices e os mecanismos de transição através dos estágios de desenvolvimento (Guerrero *et al.*, 2006), possibilitando desenvolver métodos mais eficientes de acordo com a morfologia e o ciclo de vida do carrapato, assim como evitar a transmissão de parasitas presentes na saliva como *Anaplasma* e *Babesia*.

1.7 - *Bos indicus* x *Bos taurus*

No melhoramento de raças bovinas européias, a prevalência de ectoparasitas era baixa e não foi muito importante, ou seja, não houve seleção atuante e por isso a espécie *Bos taurus*, que representa a maioria das raças selecionadas para produção, possui menor resistência aos parasitas se comparada à subespécie *Bos indicus*. A maior resistência ao carrapato encontrada na subespécie *B. indicus* deve-se à convivência de milhares de anos dos rebanhos indianos com o carrapato, resultando em uma eliminação dos animais mais sensíveis por seleção natural, restando aqueles que são mais resistentes geneticamente (Thiesen, 1979; Lemos, 1986), podendo ser até 15 vezes mais resistentes de acordo com o número de teleógenas caídas no pasto (Moraes *et al.* 1986). Diversos estudos têm demonstrado as diferenças de resistência entre *Bos taurus* e em cruzamentos de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Byford *et al.* (1976), avaliando raças de *Bos taurus* e em cruzamentos de *Bos taurus* x *Bos indicus*, encontrou resistências que vão de moderada a alta, assim como resultados semelhantes foram encontrados por Utech *et al.* (1982) na Austrália, onde os níveis de resistência dos bovinos foram medidos de acordo com a mortalidade das fêmeas de carrapatos e observou-se um aumento de resistência de 89,2% para 99% com a introdução de animais resistentes e eliminação de animais sensíveis ao carrapato.

A escolha de raças mais resistentes para debelar o problema do carrapato é um método bastante efetivo, pois Riek (1962), Johnston e Haydock (1969), Seifert (1971), Turner e Short (1972) e Wagland (1975) encontraram diferenças entre as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, assim como Lemos *et al.* (1985), que estudou a resistência ao carrapato em novilhas que variavam de ¼ Holandês x Zebu até animais Holandês puros, verificando o aumento do número de carrapatos com efeito aditivo significativo de acordo com a proporção de genes oriundos do Holandês. Wambura (1998) também demonstrou que o gado zebuino carrega menor número de carrapatos se comparado aos seus cruzamentos com *B. taurus*, podendo possuir até quatro vezes e meia menos carrapatos (Latif, 1984), indicando que subespécie *B. indicus* é menos susceptível e adquire resistência aos carrapatos mais efetivamente do que *B. taurus* (Riek, 1962; Francis & Little, 1964; Utech *et al.* 1978).

Apesar da variabilidade genética para resistência ao carrapato ser bem documentada, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na manifestação da

resistência. A utilização de métodos que visam a identificação de genes que estejam associados à resistência aos carrapatos nos programas de melhoramento seria uma das maneiras de evitar perdas de produtividade (Martinez *et al.*, 2004). Frisch (1994) através de métodos quantitativos, sugeriu a presença de um gene com grande efeito sobre o número de carrapatos em um cruzamento Shorthorn x Hereford e os resultados apresentados por Frisch (1999) indicam que é possível o desenvolvimento de animais *Bos taurus* com grande resistência ao carrapato.

A compreensão do mecanismo de resistência aos carrapatos pode conduzir à inserção desses conhecimentos nos programas de seleção e melhoramento genético animal (Teodoro, 2004), na tentativa de obter animais resistentes oriundos de cruzamentos entre as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*.

1.8 – QTLs do cromossomo 14

No BTA 14 alguns QTLs para características de crescimento são descritos na literatura. Hetzel *et al.* (1997) encontraram uma região que foi significativamente associada às características peso ao nascimento e ganho de peso dos seis aos 12 meses, em uma população resultante do cruzamento *Bos taurus* x *Bos indicus*. Buchanan *et al.* (2000) encontraram um marcador significativo para peso à desmama, peso ao sobreano e ganho médio sob pastagem a 67 cM do centrômero e outro QTL para peso ao nascimento e ganho médio diário em confinamento na região centromérica. Morris *et al.* (2002) verificaram um QTL na região entre 10 a 30 cM que influenciava características de crescimento como peso dos 250 aos 600 dias, ganho de peso dos 250 aos 400 dias, ganho de peso dos 400 aos 600 dias e peso de carcaça quente. Também na região centromérica do BTA14, um QTL para deposição de gordura foi encontrado por Casas *et al.* (2000), havendo evidência de interação desta região com o gene *miostatina* no cromossomo 2 (BTA 2), em uma população resultante do cruzamento Piemontês x Angus. A *miostatina* regula negativamente o desenvolvimento muscular e animais que possuem mutação no éxon 3 comumente apresentam o fenótipo da dupla musculatura (Sonstegard *et al.* 1998).

Três características de crescimento foram associadas por Kneeland *et al.* (2004) à haplótipos no BTA 14 em animais de uma linha comercial de *Bos taurus*.

Alguns destes haplótipos envolviam três dos sete marcadores usados no presente trabalho (CSSM066, BMC1207 e BMS1899), que foram associados no trabalho de Kneeland *et al.* (2004) a peso ao nascimento, compreendendo as regiões 26,0-26,7 cM (CSSM066), 36,2-46,2 cM (BMC1207) e 52,0-67,7 cM (BMS1899). Haplótipos associados a ganho médio diário pré-desmama encontravam-se nas regiões 26,7-36,2 cM, 36,2-46,2 cM e 46,2-50,8 cM e os haplótipos associados a ganho médio diário pós-desmama foram encontrados nas regiões 17,0-23,0 cM, 22,0-24,0 cM e 36,2-46,2 cM. Mizoshita *et al.* (2004) encontraram cinco QTL relacionados à características de crescimento no BTA 14, sendo que os QTL para ganho médio diário dos nove aos 30 meses durante a engorda, peso corporal no abate e peso de carcaça foram localizados na região de 45-51 cM, enquanto os QTL para peso corporal aos nove meses antes da engorda e ganho médio diário antes da engorda foram localizados na região 29-42 cM.

No BTA14 são relatados alguns QTLs relacionados à produção de leite. Uma vez que as raças utilizadas neste trabalho são voltadas comercialmente à produção de leite, essa informação pode ser relevante para futuros estudos de mapeamento de QTLs na população F1. Na região centromérica do BTA14, Coppieters *et al.* (1998) encontraram efeitos muito significativos para porcentagem de gordura, porcentagem de proteína e quantidade de leite, enquanto Mosig *et al.* (2001) encontraram uma significativa associação entre o marcador BL1036, usado neste trabalho, com porcentagem de proteína no leite em uma população da raça Holstein israelense. Heyen *et al.* (1999) estudando uma população de bovinos da raça Holandesa encontraram associações entre alguns marcadores do BTA14 (ILSTS39, CSSM066, BM1508 e BM4305) e características de produção de leite, tais como quantidade de gordura, porcentagem de gordura, porcentagem de proteína e quantidade de leite. Ashwell *et al.* (2001), ao estudarem oito grandes famílias de animais da raça Holandesa e analisando o marcador BMS1678, encontraram evidência de QTL afetando porcentagem e quantidade de gordura em duas das famílias estudadas, assim como Riquet *et al.* (1999), que relataram um QTL afetando a produção de leite e porcentagem de gordura na mesma região, ao realizar um mapeamento fino no BTA14. Schnabel *et al.* (2005), utilizando famílias de meio-irmãos da raça Holandesa, identificou um QTL significativo afetando quantidade de leite e porcentagem de proteína a 53 cM do centrômero, confirmando a existência de um segundo QTL para produção de leite no BTA14. Esses QTLs

relacionados à produção de leite podem estar direta ou indiretamente relacionados ao gene diacilglicerol-aciltransferase-1 (*DGAT1*), que está associado a um efeito sobre o conteúdo de gordura no leite (Grisart *et al.*, 2002).

Além dos QTLs encontrados no BTA14, alguns genes candidatos são descritos na literatura. Dois genes candidatos residem na região centromérica do BTA 14 para produção de gordura, o primeiro é o gene *DGAT1* e o segundo gene é o da tireoglobulina (*TG*) (Barendse, 1999), que está associado com deposição de gordura intramuscular. Moore *et al.* (2003) estudando estes dois genes, encontraram ambos os genes segregando independentemente da espessura de gordura em três populações independentes, indicando que estas mutações podem não ser a causa das diferenças na deposição de gordura na carcaça. Outro gene candidato é o CRH (hormônio liberador de corticotrofina), localizado a 50 cM do centrômero e que tem como função a secreção de glicocorticóides, que são considerados inibidores de crescimento. A IL7, situada a 61 cM do centrômero, é outro gene candidato, sendo relacionado principalmente com o sistema imunológico, onde age estimulando o amadurecimento dos linfócitos T e B, que atuam na resistência a patógenos. O gene candidato CYP11B1 catalisa algumas reações chave na biossíntese de hormônios esteróides, e está situado a 2 cM do centrômero.

Portanto, este trabalho faz parte de um grande projeto realizado pela EMBRAPA e que tem como objetivo realizar a varredura do genoma bovino, utilizando marcadores microssatélites e procurando associá-los a diversas características de crescimento e de resistência. A escolha do BTA14 foi feita então a partir dos trabalhos com QTLs e também de genes candidatos, ambos descritos na literatura, para características de produção.

HIPÓTESE E OBJETIVO

2 - Hipótese e Objetivo

Utilizando um delineamento de animais F2, obtidos através do cruzamento entre animais das raças Holandesa (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*), é possível mapear *loci* que controlam características de crescimento e de resistência a doenças.

O objetivo deste trabalho foi mapear QTLs para características de crescimento e de resistência a ectoparasitas e endoparasitas por meio da varredura do cromossomo 14 de bovinos, utilizando marcadores microssatélites em uma população F2 Holandês x Gir.

MATERIAL E MÉTODOS

3 – Material e Métodos

3.1 – População experimental

Para a realização do experimento, um cruzamento entre animais F1 das raças Gir e Holandesa está sendo desenvolvido, com cerca de 400 animais F2 obtidos até o momento. O cruzamento está sendo realizado na Estação Experimental Santa Mônica, pertencente à Embrapa, em Vassouras, no estado do Rio de Janeiro.

O cruzamento dos animais parentais foi feito com 28 fêmeas Gir (em um trabalho de superovulação e transferência de embriões) que foram inseminadas artificialmente por quatro touros da raça Holandesa, resultando em 150 animais F1 (incluindo machos e fêmeas) (Figura 1). Desses, apenas cinco machos foram escolhidos, com base na sua fertilidade, para serem os pais da geração F2. Cada uma das 61 fêmeas F1 foi acasalada com um dos cinco touros, constituindo cinco famílias, evitando-se parentesco entre o reprodutor e as fêmeas designadas a ele. As famílias produziram cerca de 400 animais F2 (Figura 2). Segundo Beckman & Soller (1988) esta progênie está dentro do número recomendado para o sucesso na detecção de ligação entre um marcador genético e um QTL de efeito aditivo igual ou superior a 0,5.

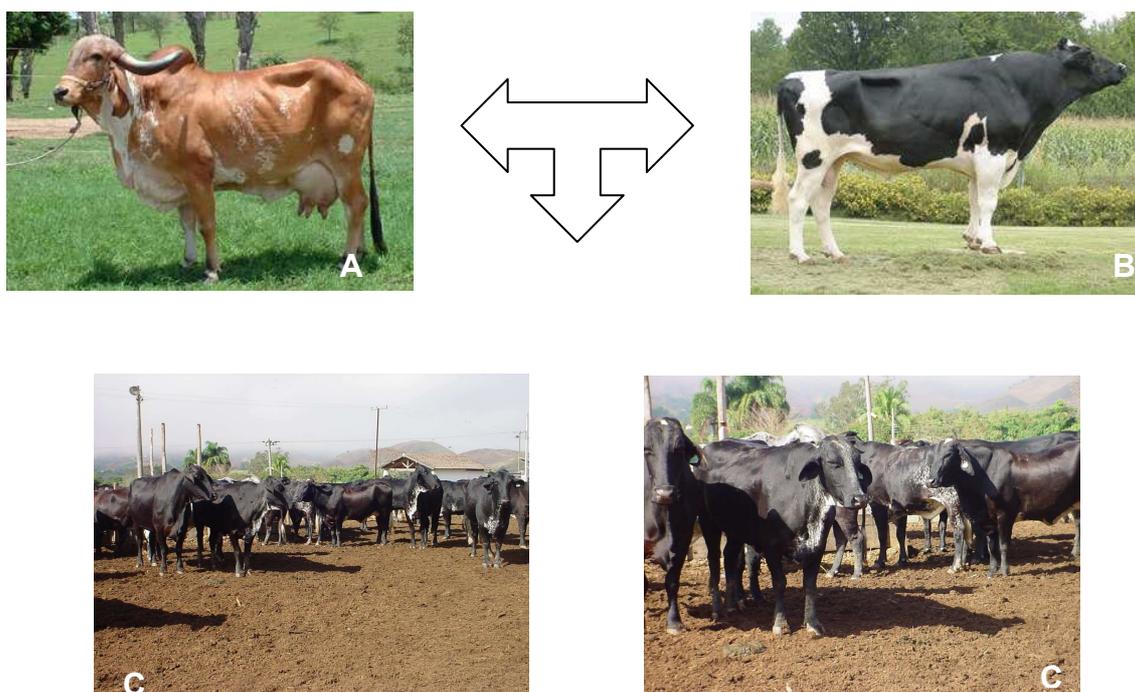


Figura 1 – Cruzamentos realizados para a obtenção da geração F1. Parentais Gir (A) e Holandês (B) cruzados para a obtenção de animais F1 (C), mostrando homogeneidade fenotípica.

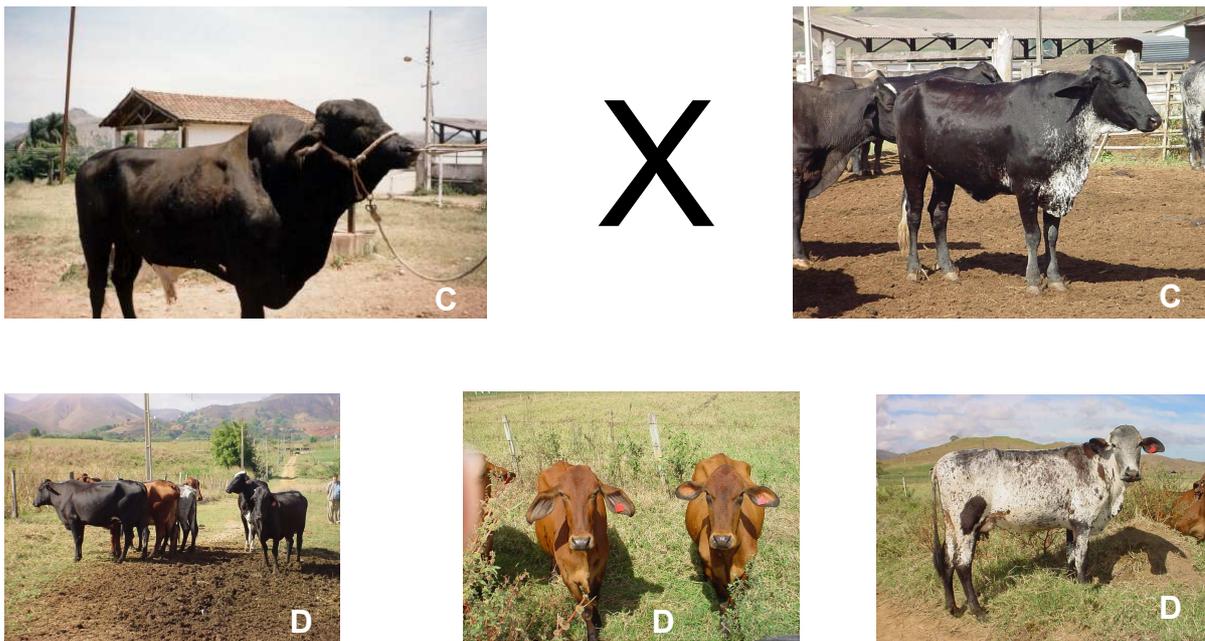


Figura 2 – Cruzamentos realizados para a obtenção da geração F2. Touros F1 (C) cruzados com fêmeas F1 (C), resultando em uma progênie de animais F2 (D), ilustrando a segregação de caracteres morfológicos.

3.2 – Coleta de sangue e extração de DNA

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais (incluindo parentais, F1 e F2) para a extração de DNA. A exceção foi a dos touros holandeses, dos quais o DNA foi extraído a partir de sêmen.

O DNA foi extraído no Laboratório de Biotecnologia Animal da EMBRAPA Gado de Leite, seguindo o protocolo de Hallerman *et al.* (1988). Para a extração de sêmen, foi utilizado o protocolo de Zadworny & Kuhnlein, 1990.

Todas as amostras foram quantificadas num espectrofotômetro (HITACHI modelo U-2000) onde foram realizadas medidas em dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. O comprimento de onda 260 nm mede a concentração de DNA e o comprimento de onda 280 nm mede a concentração de proteínas e a partir da razão obtida entre estes dois comprimentos de onda é calculada a proporção da concentração de proteínas na amostra em relação à concentração de DNA.

As amostras tiveram sua diluição padronizada para 40 ng/ μ L e foram armazenadas em tubos eppendorff a uma temperatura de -25° C.

3.3 – Coleta dos dados fenotípicos

A avaliação das características fenotípicas foi feita no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente à EMBRAPA Gado de Leite, localizado no município de Valença, estado do Rio de Janeiro.

A avaliação do peso ao nascimento e peso aos 60 dias foi feita logo após o nascimento dos bezerros, que foram induzidos a ingerir o colostro, permanecendo junto à mãe durante as primeiras 24 horas de vida para ter acesso livre ao colostro, período no qual são pesados. Em seguida, foram levados para gaiolas individuais, recebendo quatro litros de leite por dia, além de feno, ração concentrada e água à vontade até os 56 dias. Após essa idade, foram agrupados em lotes de acordo com a idade, e recriados em piquetes de grama-estrela (*Cynodon nlemfuensis*), até a idade de 12 meses, quando foram transferidos para pastos de braquiária (*Brachiaria sp*).

A avaliação da resistência ao ectoparasita *Boophilus microplus* utilizou a avaliação absoluta para determinação do nível de resistência dos animais F2, que foi realizada através da contagem das fêmeas de carrapatos que completaram o seu ciclo após a infestação artificial. Para que a avaliação da resistência fosse precisa, foram feitas infestações artificiais com 10.000 larvas por animal e as contagens foram feitas no 21º dia após a infestação.

Para a infestação, as larvas foram colocadas em dois frascos contendo o equivalente a 10.000 larvas, que foram inseridos em colar adaptado colocado na região cervical do animal, para que as larvas pudessem atingir os dois lados do corpo.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, com idade de 10 a 14 meses, cerca de 20 a 30 animais por grupo e mantidos a pasto, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. As infestações ocorreram em duas épocas do ano, na estação chuvosa e na estação seca. Como esse processo encontra-se em execução, alguns animais possuíam apenas uma observação no conjunto de dados utilizado. Foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, somente de um lado do animal, multiplicando o resultado por dois para a obtenção do número total de carrapatos por animal. As contagens geralmente foram feitas no período da manhã, antes que a maioria dos carrapatos se desprendesse dos animais.

A avaliação da resistência aos endoparasitas foi feita criando-se os animais durante os dois primeiros meses sem contato com nematóides e entre dois e 10 meses de idade, foram mantidos em pastagem de *Brachiaria* sem controle de nematóides gastrointestinais. Ao completarem entre 10 e 12 meses, foram formados grupos de aproximadamente 20 a 25 animais, que foram transferidos para uma pastagem altamente infectada com nematóides gastrointestinais, visando a mensuração de suas imunidades individuais. Durante um período de 20 semanas, os animais foram monitorados em relação à contagem de ovos de nematóides por grama de fezes, por meio da realização do exame de fezes com a utilização da técnica de flutuação pelo açúcar. Os animais foram observados diariamente para detecção de possíveis alterações clínicas e semanalmente, além da pesagem, foi colhido sangue para determinação do hematócrito.

3.4 – Marcadores moleculares

A escolha dos marcadores foi baseada na sua posição no mapa (distância entre marcadores em torno de 20 cM), número de alelos e o mínimo de 50% de heterozigosidade de acordo com o mapa disponível em fevereiro de 2004 produzido pelo Meat Animal Research Center (MARC). Os sete marcadores moleculares escolhidos foram: CSSSM066 (5,0 cM), ILSTS011 (10,6 cM), BMC1207 (36,2 cM), BMS740 (44,2 cM), BMS1899 (52,0 cM), BL1036 (78,7 cM) e BMS2055 (84,1 cM). Na Figura 3 os sete marcadores estão dispostos ao longo do BTA14 com suas respectivas posições no mapa.

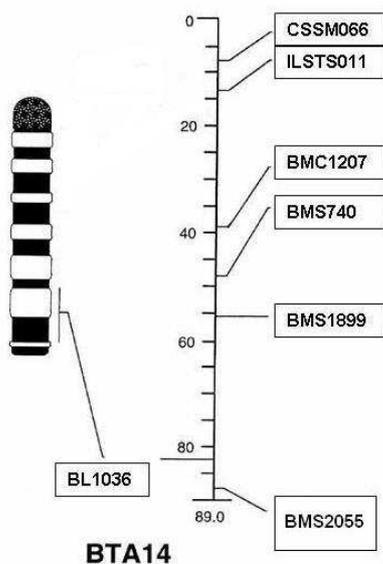


Figura 3 – Sete marcadores moleculares dispostos ao longo do BTA14.

Os marcadores foram avaliados quanto ao seu número de alelos, a heteroziguidade e seu conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) utilizando o software CERVUS v.2.0 (Marshall *et al.*, 1998) na geração F2.

3.5 – Reações em cadeia da polimerase

As reações constaram de 25 ng de DNA genômico; de 0,20 mM de dNTPs; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 µM de cada primer e 0,25 unidades de Taq polimerase num volume total de 12,5 µL. As amplificações foram feitas em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf), com as temperaturas de anelamento específicas para cada primer. Na Tabela 1 estão dispostos os sete marcadores utilizados no trabalho, com a respectiva temperatura de anelamento e fluorescência de cada marcador.

Tabela 1 – Os sete marcadores escolhidos com as respectivas temperaturas de anelamento e fluorescência

Marcador	Temperatura de anelamento	Fluorescência
CSSM066	60°C	HEX
ILSTS011	58°C	6-FAM
BMC1207	58°C	HEX
BMS740	58°C	HEX
BMS1899	58°C	6-FAM
BL1036	56°C	6-FAM
BMS2055	58°C	HEX

3.6 – Análise dos produtos de PCR

As análises dos produtos amplificados foram feitas no seqüenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems) com o auxílio dos softwares GeneScan e Genotyper. O software GeneScan realiza a leitura dos eletroferogramas indicando o tamanho dos alelos em pares de bases e a sua amplificação através da altura dos picos detectados. O software Genotyper indica quais são os alelos presentes nas amostras através de uma pré-definição dos alelos presentes nesta população, fornecendo uma tabela com o número do animal e o seu respectivo genótipo.

3.7 – Mapa de ligação

O mapa de ligação foi construído a partir dos genótipos da progênie F2, progenitores F1 e avós Holandeses e Gir (426 animais) usando o software CRIMAP (Green *et al.*, 1990), que utiliza genótipos de uma população para os marcadores escolhidos, determinando as distâncias entre os marcadores com base nas taxas de recombinação, através da função de mapeamento de Kosambi. Desta forma, o mapa foi construído usando a análise de marcadores múltiplos por meio da máxima verossimilhança com um LOD score maior que 3,0.

Com as funções *prepare*, *build*, *all* e *fixed* foi possível a construção do mapa ordenando os marcadores ao longo do cromossomo. A função *prepare* inicia a construção do mapa de ligação, a função *build* determina a ligação entre os marcadores e os ordena de acordo com a taxa de recombinação, a função *all* testa todas as posições possíveis dos marcadores e para cada posição gera um valor de log, que quanto menos positivo, melhor indica a ordem dos marcadores. A função *fixed* foi realizada para a determinação do tamanho do cromossomo transformando as taxas de recombinação em distância entre os marcadores em cM.

A função *chrompic* foi usada para mostrar a origem dos alelos parentais, mostrando a fase de ligação existente no cromossomo e dando o número de recombinações para cada intervalo de cromossomo e se os alelos vieram de origem materna ou paterna.

3.8 – Mapeamento de QTLs

Para a detecção dos QTLs, alguns fatores são importantes, como o número e localização dos genes que controlam a característica, efeito dos genes e as suas interações e também a sua herdabilidade. Segundo Lander & Botstein (1989), fatores associados à metodologia também são importantes, como o tipo de população estudada, tamanho da população, número e tamanho das famílias estudadas e a densidade de marcadores por cromossomo. Sendo assim, ao aumentarmos a quantidade de marcadores e o tamanho das famílias estudadas, estaremos aumentando o poder estatístico para a detecção dos QTLs.

O software QTL Express (Seaton *et al.*, 2002) em <http://qtl.cap.ed.ac.uk> foi utilizado para a detecção de um possível QTL utilizando três tipos de arquivos: um arquivo contendo os genótipos dos animais, um arquivo contendo o mapa do cromossomo com as distâncias entre eles e um arquivo de fenótipos.

Para a detecção do QTL foi utilizada a opção de análise de F2 através do método de regressão linear (Haley *et al.* 1994), onde a estatística F é calculada para testar a hipótese de segregação do QTL a cada 1 cM entre os marcadores através de mapeamento por intervalo.

Para as características peso ao nascimento e peso aos 60 dias, o modelo incluiu os efeitos fixos de sexo e grupo contemporâneo (compostos por dia, mês, ano de nascimento e sexo), ordem de parto como covariável e efeito aditivo do QTL.

Para a característica contagem de carrapatos foi utilizado o procedimento de linearização das variáveis por transformação $\log_{10} + 1$ do número de carrapatos e o modelo incluiu os efeitos fixos de ano de contagem e sexo, idade como covariável e efeito aditivo do QTL. Para a característica contagem de ovos por grama de fezes, os valores dos dados fenotípicos foram transformados por $\log_{10} + 1$ e ajustados para os efeitos fixos e covariáveis.

Foram adotadas 1.000 e 10.000 permutações para obter estimativas estáveis para os valores de $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$ (Churchill & Doerge, 1994), respectivamente, e o método de bootstrap para a determinação do intervalo de confiança (IC) para a presença de um possível QTL (Visscher *et al.*, 1996).

O método de bootstrap com reamostragem proposto por Visscher *et al.* (1996) para determinar o intervalo de confiança retira amostras (indivíduos) da população que contém informação sobre genótipo e fenótipo, gerando uma nova população com amostras com reposição, onde a análise estatística é usada para identificar o QTL. Após certo número de reamostragens feitas e a análise de QTL de novas populações, um intervalo de confiança de 95% é determinado pela ordenação das estimativas geradas, retirando-se 2,5% dos valores que representam as extremidades superior e inferior da distribuição. A amplitude do intervalo de confiança depende do tamanho da população e do efeito do QTL, embora a variação do espaçamento entre os marcadores não resulte em intervalos de confiança diferentes (Visscher *et al.*, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Marcadores microssatélites

Os microssatélites escolhidos para a realização da varredura do cromossomo 14 foram: CSSM066, ILSTS011, BMC1207, BMS740, BMS1899, BL1036 e BMS2055 de acordo com a base de dados do Meat Animal Research Center (MARC). Na Tabela 2 estão apresentados os marcadores com as suas respectivas percentagens de animais genotipados separados por geração (parentais, F1 e F2).

Tabela 2 – Sete marcadores microssatélites utilizados, com suas respectivas percentagens de animais genotipados por geração

Marcador	Parentais	F1	F2
CSSM066	32 (100%)	72 (98%)	369 (99%)
ILSTS011	32 (100%)	71 (96%)	361 (97%)
BMC1207	32 (100%)	72 (98%)	337 (91%)
BMS740	32 (100%)	72 (98%)	361 (97%)
BMS1899	32 (100%)	72 (98%)	364 (98%)
BL1036	32 (100%)	72 (98%)	368 (99%)
BMS2055	32 (100%)	72 (98%)	360 (97%)

Através do software CERVUS v.2.0 (Marshall *et al.*, 1998), foram calculados os valores da heterozigidade e do PIC para cada marcador conforme a Tabela 3. O maior e o menor valor da heterozigidade esperada foram observadas para os marcadores CSSM066 e BMC1207, com as valores de 0,845 e 0,434, respectivamente. A media da heterozigidade na população foi de 0,716, indicando que a maioria dos marcadores usados neste trabalho são polimórficos. Para qualquer marcador molecular, um *locus* com heterozigidade maior que 70% pode ser considerado altamente polimórfico (Ott, 1992).

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) nos fornece a probabilidade de um parental ser heterozigoto para um *locus* marcador e o outro parental possuir um genótipo diferente (Botstein *et al.*, 1980). O valor de PIC geralmente é referido como uma medida da utilidade de um *locus* marcador na análise de ligação. A média

dos valores de PIC na população foi 0,674, e o maior (0,824) e menor (0,385) valores de PIC foram dos marcadores CSSM066 e BMC1207, respectivamente. Quanto mais heterogênea for a distribuição das frequências alélicas de um marcador menores serão os valores de PIC, fato que explica dois dos marcadores utilizados com igual número de alelos apresentarem valores de PIC distintos, como foi o caso dos marcadores BMC1207 e BMS2055 (Tabela 3).

Tabela 3 – Marcadores escolhidos com os números de alelos, sua heterozigosidade e valores de PIC.

Marcador	Número de alelos	Heterozigosidade	PIC
CSSM066	7	0,845	0,824
ILSTS011	3	0,665	0,590
BMC1207	4	0,434	0,385
BMS740	6	0,826	0,800
BMS1899	6	0,781	0,747
BL1036	8	0,784	0,757
BMS2055	4	0,674	0,617

4.2 – Características fenotípicas

Dentre as características de resistência, foram utilizadas a contagem de carrapatos (ectoparasitas) e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (endoparasitas). A Tabela 4 ilustra a média geral do número de carrapatos e a média separada por sexo e o desvio padrão, enquanto a Tabela 5 ilustra a média estimada e o desvio padrão para a característica contagem de ovos por grama de fezes. Os dados contidos nas Tabelas 4 e 5 são os dados brutos obtidos através da observação no campo, e para que estes dados pudessem ser utilizados na análise e mapeamento de QTL, eles foram normalizados por Box-Cox para carrapatos e $\log_{10} n+1$ para endoparasitas.

Tabela 4 – Médias e desvio padrão para a característica contagem de carrapatos incluindo média geral do número de carrapatos, média do número de carrapatos nos machos e média do número de carrapatos nas fêmeas.

Média geral do número de carrapatos	Média do número de carrapatos dos machos	Média do número de carrapatos das fêmeas
32,02 ± 41,57	29,88 ± 35,48	36,14 ± 48,29

Tabela 5 – Média estimada e desvio padrão para a característica contagem de ovos por grama de fezes.

Média do número de ovos por grama de fezes	39,43 ± 77,89
---	---------------

4.3 – Mapa de ligação

O mapa de ligação foi construído utilizando o software CRIMAP a partir do número de meioses informativas, onde na Tabela 6 estão representados o número de meioses informativas de cada marcador, comparando as meioses obtidas neste trabalho com as meioses obtidas no mapa utilizado como referência (MARC).

Tabela 6 – Comparação entre o número de meioses informativas do mapa EMBRAPA e do mapa MARC para cada marcador

Marcadores	Número de meioses informativas (EMBRAPA)	Número de meioses informativas (MARC)
CSSM066	562	241
ILSTS011	535	265
BMC1207	234	839
BMS740	598	422
BMS1899	561	363
BL1036	536	249
BMS2055	415	422

Na Tabela 7 estão dispostos os marcadores com as respectivas taxas de recombinação entre eles, sua distância em relação ao marcador anterior e sua posição no mapa de ligação.

Tabela 7 – Mapa de ligação com as taxas de recombinação dos marcadores e sua posição relativa no mapa

Marcador	Fração de recombinação	Distância em relação ao marcador anterior (cM)	Posição no mapa (cM)
CSSM066	0,16	-	0,0
ILSTS011	0,27	16,9	16,9
BMC1207	0,19	30,8	47,8
BMS740	0,22	20,0	67,7
BMS1899	0,23	23,9	91,6
BL1036	0,25	25,2	116,8
BMS2055	-	27,5	144,3

O mapa de ligação apresentou a mesma ordenação, porém distâncias maiores se comparado ao mapa utilizado como referência (MARC) conforme apresentado na Tabela 8. A opção *chrompic* foi realizada para observar as recombinações sofridas por cada animal e a origem dos alelos. Quando havia muitas recombinações, o genótipo do animal era conferido novamente no software *GeneScan*.

Tabela 8 – Comparação das distâncias no mapa de ligação do cromossomo 14 entre o mapa referência MARC e o mapa obtido pela EMBRAPA

Marcador	MARC	EMBRAPA
CSSM066	5,0	0,0
ILSTS011	10,6	16,9
BMC1207	36,2	47,8
BMS740	44,2	67,7
BMS1899	52,0	91,6
BL1036	78,7	116,8
BMS2055	84,1	144,3

As distâncias dos marcadores encontradas no mapa EMBRAPA foram maiores do que no mapa utilizado como referência. Diversos fatores afetam as distâncias entre os marcadores, entre eles, o tamanho amostral e a informatividade dos marcadores utilizados, que determinam a probabilidade de se detectar eventos de recombinação. No caso do mapa EMBRAPA, o número de meioses informativas é superior ao mapa MARC, exceto em dois marcadores, o que pode ter contribuído para o aumento das distâncias entre os marcadores, pois o mapa de ligação é construído com base no número de recombinações entre os marcadores e a posterior transformação em distância (em cM) através da função de Kosambi.

4.4 - Mapeamento de QTLs para características de crescimento

Para o mapeamento de QTLs relacionados à crescimento foram analisadas as características peso ao nascimento (PN) e peso aos 60 dias (P60). O mapeamento foi feito com o software QTL Express (Seaton *et al.*, 2002). Para a característica PN foi encontrado um QTL sugestivo ($P < 0,05$) a 1 cM do marcador mais centromérico (Figura 4), com estatística $F = 7,62$. A média do peso dos animais foi de 29,59 +/- 0,57 kg e o efeito aditivo do QTL foi de 1,21 +/- 0,43 kg, valor que corresponde a 4 % da média do peso dos animais. O sinal positivo do efeito de substituição estimado pelo software indica que o alelo que contribui para um maior peso ao nascimento foi herdado do parental da raça Holandesa. O efeito do sexo do

animal foi estimado em $-1,92 \pm 0,57$ kg para as fêmeas, resultado previsto devido ao menor tamanho das fêmeas. A análise de bootstrap determinou um intervalo de confiança de 144, entre 0,0 e 144,0 cM.

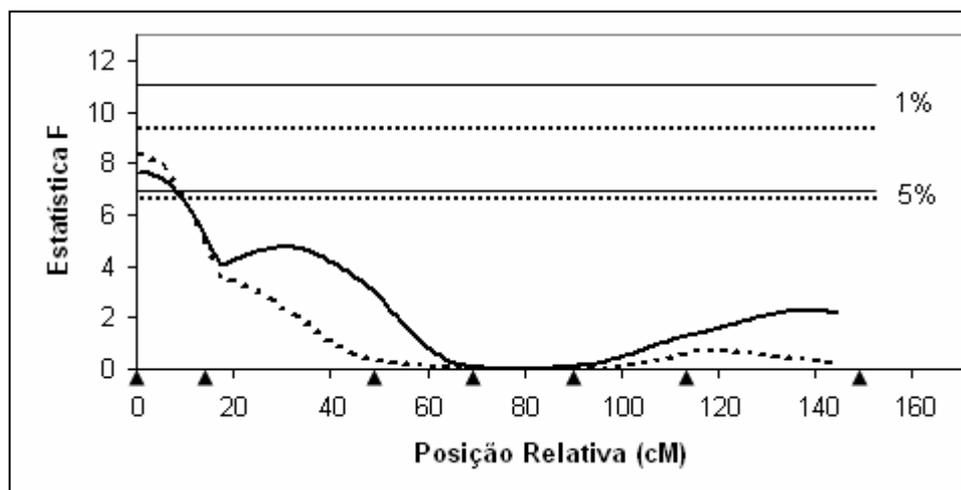


Figura 4 – Distribuição da estatística F para peso ao nascimento (linha contínua) e peso aos 60 dias (linha tracejada), ao longo do cromossomo 14, utilizando o mapa EMBRAPA. As setas sob o eixo X indicam as posições dos marcadores no cromossomo a partir do centrômero: CSSSM066, ILSTS011, BMC1207, BMS740, BMS1899, BL1036 e BMS2055. Para peso ao nascimento, o QTL sugestivo foi encontrado a 1 cM com uma estatística F de 7,62. A linha contínua superior indica significância de 1% ($F = 11,33$) e a linha contínua inferior indica significância de 5% ($F = 7,20$), para peso ao nascimento. Para peso aos 60 dias, o QTL sugestivo foi encontrado a 0 cM, com uma estatística F de 8,34, onde a linha tracejada superior indica significância de 1% ($F = 9,61$) e a linha tracejada inferior indica significância de 5% ($F = 6,98$), para peso aos 60 dias.

A análise de intervalo da característica peso aos 60 dias revelou a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,05$) a 0 cM com estatística $F = 8,34$ (Figura 4). O intervalo de confiança para este QTL foi de 137,5 cM, de 0,0 a 137,5 cM em relação ao marcador mais centromérico (CSSM066). O efeito de sexo foi estimado em $-4,17 \pm 0,99$ kg para as fêmeas e o efeito aditivo do QTL foi de $2,12 \pm 0,73$ kg, valor que corresponde a 7,2% da média da característica. O sinal positivo do efeito de substituição indica que o alelo que contribui para um maior peso aos 60 dias também foi herdado do parental da raça Holandesa.

Apesar dos dois QTLs para características de crescimento terem sido apenas sugestivos ao nível do cromossomo, resultados semelhantes foram obtidos para as

duas características, o que era esperado por se tratar de características correlacionadas. O nível de significância destes QTLs pode ser melhorado ao acrescentarmos mais marcadores na região, saturando-a de modo que possamos aumentar o poder estatístico para o mapeamento do QTL. O aumento do número de animais por família também contribuiria para confirmar a presença deste QTL, uma vez que quanto mais animais dispusermos dentro de cada família, melhor estarão representadas as combinações genotípicas dentro de cada família.

Alguns trabalhos relacionados com características de crescimento também relatam a presença de QTL na parte centromérica do cromossomo 14, como o de Morris *et al.* (2002) que encontraram um QTL entre 10 e 30 cM influenciando características de crescimento como peso dos 250 aos 600 dias, ganho de peso dos 250 aos 400 dias, ganho de peso dos 400 aos 600 dias e peso de carcaça quente. Três características de crescimento foram utilizadas por Kneeland *et al.* (2004), que as associaram a haplótipos em animais *Bos taurus*, que envolveram três dos marcadores usados neste trabalho (CSSM066, BMC1207 e BMS1899). As regiões associadas a peso ao nascimento foram entre 26,0 a 67,7 cM, para ganho médio diário pré-desmama foram associadas as regiões entre 26,7 a 50,8 cM e entre a regiões 17,0 a 46,2 cM, os haplótipos foram associados a ganho médio diário pós-desmama sob regime de pastagem.

Também trabalhando com características de crescimento, Mizoshita *et al.* (2004) encontraram cinco QTLs, como ganho médio diário dos 9 aos 30 meses durante a engorda, peso corporal no abate e peso de carcaça foram encontrados na região de 45-51 cM, enquanto peso corporal aos 9 meses antes da engorda e ganho médio diário antes da engorda se localizaram na região de 29-42 cM. Utilizando um mapa físico de alta densidade incluindo 80 microssatélites, uma região de 1,1 Mb no cromossomo 14 foi identificada como responsável pelo QTL de peso de carcaça anteriormente relatado, chegando à conclusão de que nessa região de 45-51 cM existe um gene responsável por essa característica (Mizoshita *et al.*, 2005).

A correlação existente entre PN e P60 é alta, o que reforça a hipótese de existirem nessa região centromérica do BTA14, genes que atuam sobre o crescimento perinatal dos bovinos. Buchanan *et al.* (2005) identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) presente no BTA14, que foi associado com peso de carcaça quente. Este hormônio causa indiretamente a liberação de glicocorticóides (Dunn &

Berridge 1990), que são responsáveis por inibir o crescimento e é comumente referido como hormônio do estresse. Através de estudos que combinaram dados de Zoo-FISH (Solinas-Toldo *et al.* 1995), etiquetas âncora de sequências comparativas (CATS) (Lyons *et al.* 1996) e mapeamento de ligação usando RFLPs de tireoglobulina (Barendse *et al.* 1994), conclui-se que a extremidade centromérica do BTA14 corresponde à extremidade telomérica do cromossomo 8 de humanos. O refinamento da posição do QTL identificado, por mapeamento de desequilíbrio de ligação, permitiria uma identificação mais precisa de segmentos ortólogos do cromossomo humano, provendo uma lista de genes candidatos posicionais e etiquetas de seqüências expressas (ESTs) (Coppieters *et al.* 1998). Com a publicação da versão preliminar da seqüência do genoma bovino coordenada pelo Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS), as possibilidades de obter êxito na busca por genes candidatos aumentaram, permitindo inferir funções nas seqüências que possuem homologia com organismos já sequenciados.

Ao considerarmos as características PN como característica reprodutiva e não como característica de crescimento, estamos levando em conta o fato de que um grande peso ao nascimento pode dificultar o parto e um crescimento precoce a partir do nascimento seria de grande interesse aos produtores. Ashwell *et al.* (2004) ao estudarem 10 grandes famílias de animais da raça Holandesa, encontraram um provável QTL para taxa de prenhez no BTA14 a 11 cM do centrômero, no intervalo entre os marcadores ILSTS011 e CSSM066, os mesmos marcadores utilizados neste trabalho. Ainda no trabalho de Ashwell *et al.* (2004), eles discutem que o QTL encontrado pode ser influenciado pelo gene *DGAT1*, que também foi mapeado na região centromérica e catalisa o último passo na síntese de triglicérides, onde mutações no gene *DGAT1* podem ter efeitos pleiotrópicos no nível de prenhez. Schnabel *et al.* (2005) no estudo de duas famílias da raça Holandesa, encontraram um QTL para taxa de prenhez das filhas a 60 cM do centrômero, entre os marcadores BMC1207 e BMS1899, também utilizados neste trabalho. Os efeitos de substituição dos alelos para os trabalhos de Ashwell *et al.* (2004) e Schnabel *et al.* (2005) foram semelhantes, possivelmente indicando que se trata de um único QTL localizado entre os dois estudos, uma vez que os mapas utilizados nos dois trabalhos diferem no seu espaçamento.

Segundo De Vries *et al.* (2000), uma mudança na relação proteína:gordura e porcentagem de gordura no leite durante as primeiras lactações podem ter efeitos negativos sobre a fertilidade das vacas, mais especificamente na atividade lútea que se inicia após o parto. Ainda no que se refere à reprodução, Gonda *et al.* (2004) identificaram um possível QTL no BTA14 para taxa de ovulação a 59 cM do centrômero, e devido à sua proximidade de 8 cM com o QTL encontrado por Schnabel *et al.* (2005), possivelmente ambos os QTLs estejam representando o mesmo gene.

4.5 - Mapeamento para característica de resistência a ectoparasitas e endoparasitas

A primeira característica analisada foi a contagem de carrapatos. Através da análise do software QTL Express, um QTL significativo ($P < 0,01$) foi encontrado a 22 cM do centrômero no BTA14 ($F = 11,46$) para contagem de carrapatos transformada (Figura 5). Os valores de significância de 1% e 5 % foram 10,76 e 7,60, respectivamente. O efeito aditivo do QTL foi de 4,08 +/- 1,20 carrapatos (valor transformado pelo método de Box-Cox), valor que corresponde a 19,2% da média da contagem de carrapatos transformada (21,27 +/- 3,40). O sinal positivo do efeito de substituição indica que o alelo que contribui para um maior número de carrapatos foi herdado do parental da raça Holandesa. O intervalo de confiança foi de 89,0 cM, de 3,0 cM a 92,0 cM, em relação ao marcador mais centromérico (CSSM066).

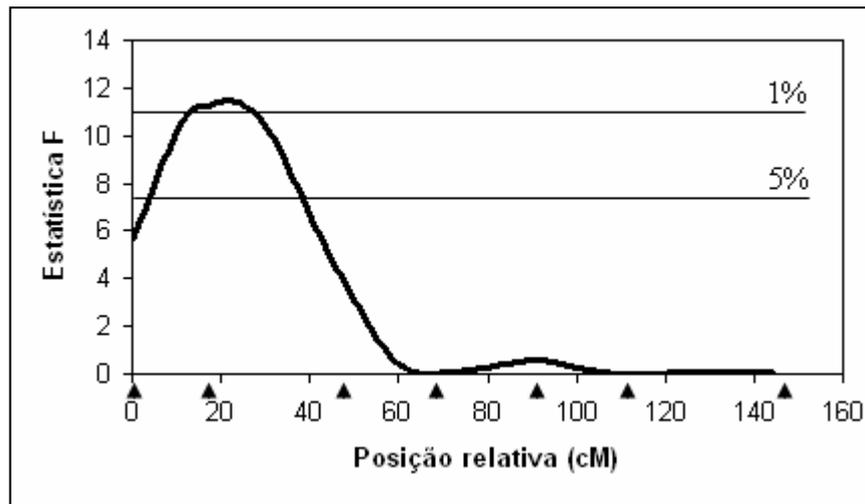


Figura 5: Distribuição da estatística F para contagem de carrapatos transformada por Box-Cox no BTA14. As setas sob o eixo X indicam as posições dos marcadores no cromossomo a partir do centrômero: CSSSM066, ILSTS011, BMC1207, BMS740, BMS1899, BL1036 e BMS2055. As linhas horizontais superior e inferior representam os níveis de significância a 1% ($F = 10,76$) e a 5% ($F = 7,60$). O QTL foi localizado a 22 cM do centrômero ($F = 11,46$).

Trabalhos de mapeamento de QTL para características de resistência à carrapatos em bovinos ainda não são conhecidos, porém, os avanços na biologia molecular têm permitido a localização de genes responsáveis por características de interesse econômico, bem como o entendimento de suas ações e interações que contribuem para a variação das características quantitativas, ou seja, características que são influenciadas por vários genes. Com a disponibilidade dos dados do genoma bovino, será possível a procura e localização de genes atuando na resistência aos carrapatos e possivelmente a descrição dos mecanismos de ação destes genes.

Broad *et al.* (1995) em seus estudos, relacionaram o cromossomo 9 de ovinos com o cromossomo 14 de bovinos, indicando que o gene IL7 está presente no BTA14, a 61 cM do centrômero. A presença do gene da IL7 pode indicar uma ação indireta na resistência a carrapatos, ou ainda, existe a possibilidade da presença de outro gene ou outros genes que estejam controlando esta característica, permitindo então que futuros estudos investiguem mais precisamente esta região no BTA14.

A resistência a carrapatos é uma das características que vem sendo utilizada há 50 anos no índice de seleção empregado nos programas de melhoramento da Estação de Pesquisa Belmont na Austrália (Frisch *et al.* 2000) e a exploração de genes de grande efeito em relação à resistência a carrapatos é uma das formas de

prevenir as perdas de produtividade (Martinez *et al.*, 2004). Há um componente genético para a variação da resistência ao carrapato e as estimativas de herdabilidade variam de muito baixa a alta, de acordo com o método de avaliação, população estudada e método estatístico (Fraga, 2003).

Frisch (1994) supôs, através de métodos estatísticos, a presença de um gene com um grande efeito sobre o número de carrapatos por animal em um cruzamento Hereford x Shorthorn (HS), onde cada cópia do gene reduzia a contagem de carrapatos em até 75%. Frisch (2000) relata que a raça Brahman é naturalmente mais resistente à parasitas, porém menos produtiva do que as raças européias, e que seus cruzamentos com raças tropicais produzem animais mais produtivos e menos resistentes, mas com o aumento do parasitismo, essa produtividade diminui. Essa desvantagem pode ser contornada então a longo prazo, com a utilização de raças européias resistentes nos cruzamentos, podendo aumentar a resistência a altos níveis através da seleção, uma vez que a resistência a carrapatos possui uma herdabilidade moderada. O aumento dessa resistência seria possível através da introgressão de genes de grande efeito em raças européias e, em combinação com as vacinas contra os carrapatos, seria possível a eliminação do uso de carrapaticidas (Frisch, 1999).

Entretanto Henshall (2004) analisando a mesma população HS estudada por Frisch (1994), encontrou diferenças entre a sua conclusão e as análises feitas anteriormente, considerando que mais dados estavam disponíveis para as suas análises e que os dados foram ajustados para os efeitos fixos e efeitos poligênicos. A segregação de um gene principal não foi evidente quando efeitos poligênicos foram incluídos no modelo, sugerindo que a variação encontrada por Frisch (1994) pode ter sido genética, mas não necessariamente devida a um único gene. Em estudos prévios, Acosta-Rodriguez *et al.* (2005) encontraram alelos da classe II do complexo de imunocompatibilidade principal (MHC) BoLA que determinam a susceptibilidade à infestação de carrapatos em duas diferentes raças no México.

A resistência aos carrapatos é uma característica complexa e dependente de vários fatores. Um fator que influencia na resistência aos parasitas é a cor da pele dos animais, pois animais mais claros são mais resistentes do que animais mais escuros. Provavelmente a susceptibilidade dos animais escuros se deve à queda da resistência devido ao estresse térmico (Fraga *et al.*, 2003). O estado fisiológico também pode causar susceptibilidade aos parasitas, pois as vacas prenhas são

menos resistentes do que as não prenhas, devido ao estresse da gravidez e as mudanças hormonais também podem causar a queda da resistência à parasitas (Utech *et al.*, 1978). Animais com pêlos curtos, lisos e assentados são mais adaptados à resistência do que animais com pêlos longos, finos e lanosos. A maior espessura do pêlo contribui para a permanência e sobrevivência de parasitas no hospedeiro e torna mais difícil a limpeza feita pelo animal e também apresenta maiores taxas de estresse térmico (Bonsma & Pretorius, 1943).

A segunda característica analisada foi a contagem de ovos por grama (OPG) nas fezes. Através da análise do software QTL Express, nenhum QTL foi associado, no BTA14, para resistência a endoparasitas gastrointestinais (Figura 6). Nessa análise, os valores críticos de significância para 1% e 5 % foram de 10,60 e 7,81, respectivamente e nenhuma indicação de QTL para essa característica foi observada no BTA14 na população F2 estudada.

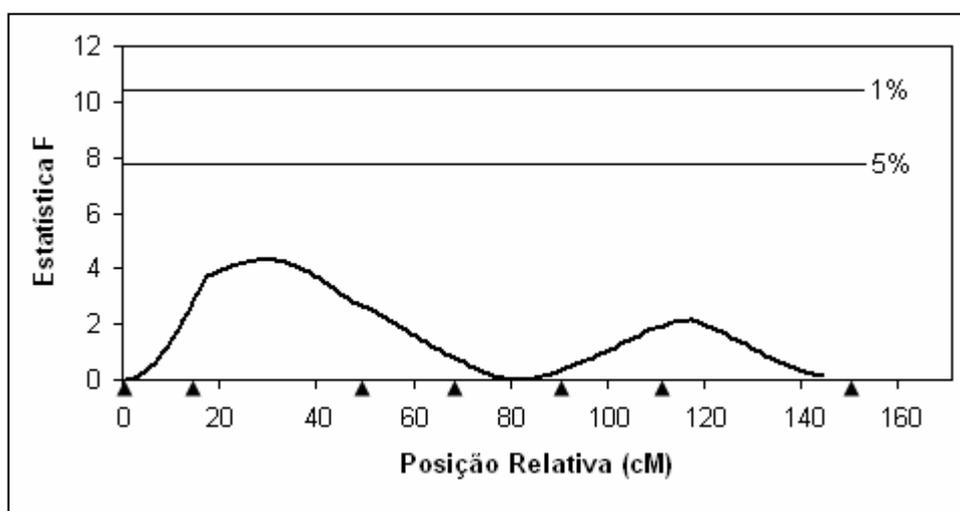


Figura 6: Distribuição da estatística F para contagem de ovos por grama de fezes no BTA14. As setas sob o eixo X indicam as posições dos marcadores no cromossomo a partir do centrômero: CSSSM066, ILSTS011, BMC1207, BMS740, BMS1899, BL1036 e BMS2055. As linhas horizontais superior e inferior representam os níveis de significância a 1% ($F = 10,60$) e a 5% ($7,81$).

Trabalhos relatando a presença de QTLs para resistência a endoparasitas no BTA14 ainda não são conhecidos, sugerindo que mais estudos se desenvolvam para a obtenção de resultados bem sucedidos. Estudos de QTLs têm sido realizados para resistência a endoparasitas em bovinos nos EUA, onde Sonstegard *et al.* (2002) encontraram prováveis QTLs para resistência a nematóides em uma população da raça Angus, nos cromossomos bovinos 1, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15,

19 e 26. Benavides *et al.* (2005) encontraram uma região no BTA6, através do uso de marcadores microssatélites, que confirmam que esta região contém um desequilíbrio de ligação em diferentes populações, sugerindo que esta região cromossômica é importante para a resistência a nematóides.

A maioria dos QTLs descritos na literatura para resistência a endoparasitas são em ovelhas. Davies *et al.* (2006) mostraram que a resistência aos endoparasitas está sob forte controle genético e os QTLs encontrados nos cromossomos 2, 3, 14 e 20 podem ser usados em uma seleção assistida por marcadores para aumentar a resistência dos hospedeiros aos endoparasitas. Good *et al.* (2006) encontraram diferenças entre as raças de ovelhas Texel e Suffolk, encontrando maior quantidade de ovos nas fezes na raça Suffolk e também uma maior quantidade de ovos nas fezes das ovelhas mais jovens quando comparadas às ovelhas mais velhas.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que é possível mapear regiões do genoma que afetam a variação de características de crescimento e de resistência à parasitas em bovinos. A investigação mais detalhada das regiões descritas deverá resultar na identificação dos genes responsáveis pela variação fenotípica, ou ao menos na redução do intervalo de confiança dos QTLs mapeados. Uma vez reduzido o intervalo de confiança, a confirmação da associação entre essas regiões e as características de interesse deverá ser realizada em populações de melhoramento.

Uma maneira de melhorar os níveis de significância dos QTLs para as características de crescimento seria o uso de mais marcadores saturando a região do QTL e mais animais a serem genotipados e analisados fenotipicamente.

Quanto à resistência ao carrapato, será importante investigar se existe segregação também dentro de raças taurinas ou se essa variação somente se aplica a *Bos indicus*.

O potencial de contribuição dessa informação ao melhoramento de bovinos é muito grande, considerando-se a magnitude do efeito atribuído ao QTL, a importância dessa característica para a produção e a dificuldade de se identificar os animais mais resistentes por métodos convencionais.

CONCLUSÃO

5 – Conclusão

A partir do delineamento experimental F2 desenvolvido pela EMBRAPA Gado de Leite, QTLs para características de crescimento (peso ao nascimento e peso aos 60 dias) e de resistência a carrapatos foram mapeados no BTA14, indicando que é possível mapear *loci* que estejam controlando a variação nas características quantitativas analisadas através da utilização de marcadores microssatélites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - Referências Bibliográficas

- ACOSTA-RODRIGUEZ, R. et al. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet. Parasitol.* v.28, n.3-4, p.313-321, 2005.
- ALBERS, G.A.A. et al. The genetic of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in young merino sheep. *Int. J. Parasitol.* v.17, p.1355-1363, 1987.
- ANDERSON, T.J.C.; BLOUIN, M.S.; BEECH, R.N. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv. Parasitol.* v.41, p.219–283, 1998.
- ANGUS, B.M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *Int. J. Parasitol.* v.26, p.1341-1355, 1996.
- ASHWELL, M.S.; VAN TASSELL, C.P.; SONSTEGARD, T.S. A genome scan to identify quantitative trait loci affecting economically important traits in a US Holstein population. *J. Dairy Sci.* v.84, p.2535–2542, 2001.
- ASHWELL, M. et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* v.87, p.468–75, 2004.
- BARENDSE, W. et al. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* v.6, p.227-235, 1994.
- BARENDSE, W. et al. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm. Genome* v.8, p.29-36, 1997.
- BARENDSE, W.J. *Assessing lipid metabolism*. International patent application PCT/AU98/00882, International Patent Publication WO 99/23248, 1999.
- BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Appl. Genet.* v.76, p.228–236, 1988.
- BENAVIDES, M.V. et al. Genetic Variability of a Box Taurus X Bos Indicus Cross Population and Validation of Genomic Regions Influencing Nematode. In: SYMPOSIUM OF GENETIC RESEARCH IN LATIN AMERICA IN THE CARIBBEAN, 2005.
- BISHOP, M.D. et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* v.136, n.2, p.619-639, 1994.
- BONSMA, J.C.; PRETORIUS, A.J. Influence of color coat cover on adaptability of cattle. *Farming in South Africa* v.18, p.101-120, 1943.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* v.32, n.3, p.314-331, 1980.
- BROAD, T.E. et al. Assignment of five loci from human chromosome 8q onto sheep chromosome 9. *Cytogenet. Cell Genet.* v.68, n.1-2, p.102-106, 1995.
- BUCHANAN, F.C. et al. Two QTLs for growth map to bovine chromosome 14. In: Scientific presentations 27th International Conference on Animal Genetics Minneapolis, 2000. USA, ISAG p.22-26.
- BUCHANAN, F.C. et al. Single nucleotide polymorphisms in the corticotrophin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin genes are associated with growth and carcass yield in beef cattle. *Anim. Genet.* v.36, n.2, p.127-131, 2005.
- BYFORD, I.; COLDITZ, P.; SIBBICK, R. A tick resistant dairy breed. *Queensland Agric. J.* v.102, n.1, p.11-15, 1976.

- CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* v.78, p.560-569, 2000.
- CASAS, E. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* v.81, p.2976-2983, 2003.
- CAVALCANTI, M.P. O Zebu: monografia das raças indianas e seu comportamento no Brasil. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Técnica; Broch, 1944.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait loci mapping. *Genetics* v.138, p.963-971, 1994.
- COPPIETERS, W. et al. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mamm. Genome* v.9, p.540-544, 1998.
- DAVIES, G. et al. Quantitative trait loci associated with parasitic infection in Scottish blackface sheep. *Heredity* v.96, n.3, p.252-258, 2006.
- DE VRIES, M.J.; VEERKAMP, R.F. Energy Balance of Dairy Cattle in Relation to Milk Production Variables and Fertility. *J. Dairy. Sci.* v.83, p.62-69, 2000.
- DUNN, A.J.; BERRIDGE, C.W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Reviews* v.15, p.71-100, 1990.
- ECHEVARRIA, F. et al. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brasil. *Vet. Parasitol.* v.62, p.199-206, 1996.
- EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 95, n.4, p.453-470, 2000.
- FARIA, F.J.C. et al. Intervalo de gerações e tamanho efetivo da população da raça Gir Mocho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA v.38, p.482-483, 2001.
- FARIAS, M.T. et al. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. *Vet. Parasitol.* v.72, n.2, p.209-214, 1997.
- FIEL, C.A. et al. Resistance of Cooperia to ivermectin treatment in grazing cattle of the humid pampa. *Vet. Parasitol.* v.97, p.211-217, 2001.
- FRAGA, A.B. et al. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). *R. Bras. Zootec.* v.32, n.6, p.1578-1586, 2003.
- FRANCIS, J.; LITTLE, D.A. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. *Aust. Vet. J.* v.40, p.247-253, 1964.
- FRISCH, J.E. Identification of a major gene for resistance to cattle ticks. In: World congress on genetics applied to livestock production. *Proceedings...Guelph*, p.293-295, 1994.
- FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* v.29, p.57-71, 1999.
- FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J.; KELLY, M.J. Using genetics to control cattle parasites – The Rockhampton experience. *Int. J. Parasitol.* v.30, p.253-264, 2000.
- FURLONG, J. et al. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on feed intake and milk yield of Holstein x Zebu crossbred cows. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE VETERINÁRIA, XV, Campo Grande, 1996.

- GASBARRE, L.C. et al. Detection of QTL affecting parasite resistance in a selected herd of Angus cattle. In: *PROCEEDINGS OF THE 7TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION*, 2002. Montpellier, France, session 13, communication p.13-07.
- GASPARIN, G. et al. Quantitative trait locus affecting birth weight on bovine chromosome 5 in a F2 Gyr x Holstein population. *Genet. Mol. Biol.* v.28, n.4, p.670-676, 2005.
- GELDERMANN, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animal by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genetics* v.46, p.319-330, 1975.
- GLASS, E.J. Genetic variation and responses to vaccines. *Anim. Health. Res. Rev.* v.5, n.2, p.197-208, 2004.
- GONDA, M.G. et al. Identification of an ovulation rate QTL in cattle on BTA14 using selective DNA pooling and interval mapping. *Anim. Genet.* v.35, p.298-304, 2004.
- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. Porto Alegre: Edição do autor, 80 p., 1993.
- GOOD, B. et al. Texel sheep are more resistant to natural nematode challenge than Suffolk sheep based on faecal egg count and nematode burden. *Vet. Parasitol.* v.136, n.3-4, p.317-27, 2006.
- GRANT, W.N. Genetic variation in parasitic nematodes and its implications. *Int. J. Parasitol.* v.24, p.821-830, 1994.
- GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS, S. *CRI-MAP Documentation version 2.4* St. Louis: Washington University School of Medicine, 1990.
- GRISART, G. et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* V.12, p.222-231, 2002.
- GRONVOLD, J. et al. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. *J. Helminthol.* v.67, p.31-36, 1993.
- GUERRERO, F.D. et al. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. *J. Med. Entomol.* v.43, n.1, p.9-16, 2006.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* v.136, p.1195-1207, 1994.
- HALLERMAN, E.M. et al. Screening of Israeli Holstein-Friesian cattle for restriction fragment length polymorphisms using homologous and heterologous deoxyribonucleic acid probes. *J. Dairy Sci.* v.71, p.3378-3389, 1988.
- HENSHALL, J.M. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. *Aust. J. Agric. Res.* V.55, p.1109-1116, 2004.
- HETZEL, J. et al. Localisation of quantitative trait loci (QTL) for growth traits in Bos Taurus X Bos indicus cattle. In: *Plant & Animal Genome V Conference*, San Diego, USA, Abstracts p.12-18, 1997.
- HEYEN, D.W. et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol. Genomics* v.1, n.3, p.165-75, 1999.
- HONER, M.R.; GOMES, A. *O manejo integrado de mosca de chifres, berne e carrapatos em gado de corte*. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1990.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv. Parasitol.* v.24, p.135-238, 1985.

- HOSKING, B.C.; WATSON, T.G.; LEATHWICK, D.M. Multigeneric resistance to oxfendazole by nematodes in cattle. *Vet. Res.* v.138, p.67-68, 1996.
- IHARA, N. et al. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* v.10A, p.1987-1998, 2004
- JOHNSTON, L.A.Y.; HAYDOCK, K.P. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on production of Brahman-cross and British-breed cattle in Northern Australia. *Aust. Vet. J.* v.45, p.175-179, 1969.
- KANOBANA, K. et al. Characterization of host responder types after a single *Cooperia oncophora* infection: kinetics of the systematic immune response. *Parasite Immunol.* V.23, p.641-653, 2001.
- KAPPES, S. M. et al. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genomic Res.* v.7, p.235-249, 1997.
- KEMP, D. H. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol.* V.7, p.43-58, 1989.
- KHATKAR, M. S. et al. Quantitative trait loci in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetic Selection Evolution* v.36, p.163-190, 2004.
- KNEELAND, J. et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for growth traits on bovine chromosomes 2, 6, 14, 19, 21 and 23 within one commercial line of *Bos Taurus*. *J. Anim. Sci.* v.82, p.3405-3414, 2004.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* v.121, p.185-199, 1989.
- LATIF, A.A. Resistance to natural tick infestations in different breeds of cattle in the Sudan. *Insect Sci. Appl.* v.5, p.95-97, 1984.
- LARSEN, M. et al. Biological control of gastrointestinal nematodes-facts, future or fiction? *Vet. Parasitol.* v.72, p.479-492, 1997.
- LEDIC, I.L. *Gir: o grande trunfo da nossa pecuária leiteira*. Ed. Peirópolis. São Paulo, 95 p., 2000.
- LEMOS, A.M. et al. Comparative performance of six Holstein-friesian x Guzerá grades in Brazil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. *Animal Productions* v.41, n.2, p.187-191, 1985.
- LEMOS, A.M. *A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato*. Documento EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, v.6, 42p., 1986.
- LI, C. et al. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* v.82, p.1-7, 2004.
- LIU, B.H. *Statistical Genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. CRC Press, USA, 611p., 1998.
- LYONS, A.L. et al. Comparative anchor tagged sequences for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet* v.15, p.47-56, 1996.
- MARQUES, D.C. *Criação de bovinos*. Livraria Nobel, 3ª ed., São Paulo, 1976.
- MACHADO, M.B.B. et al. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet. Mol. Biol.* v.26, n.3, p.259-265, 2003.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.B.E. *CERVUS version 2.0* Disponível em: <<http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html>>.
- MARTINEZ, M.L. et al. Associação do gene candidato BoLA-DRB3.2 com resistência a ectoparasitas em bovinos. (compact disc). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, v.41, Campo Grande, 2004.

MASSEY, J. M.; GEORGES, M. Genmark's approach to marker-assisted selection. *Animal Bio-technology* v.3, p.95-109, 1992.

MIZOSHITA, K. et al. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family on purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *J. Anim. Sci.* v.82, p.3415-3420, 2004.

MIZOSHITA, K. et al. Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine chromosome 14. *Mamm. Genome* v.16, n.7, p.532-537, 2005.

MOORE, S.S. et al. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* v.81, p.1919-1925, 2003.

MORAES, F.R. et al. Ecologia de carrapato XV: Susceptibilidade natural comparativa entre taurinos e zebrinos a *B. microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Ars Veterinária* v.2, n.1, p.45-53, 1986.

MORRIS, C.A. et al. Continued selection of Romney sheep for resistance or susceptibility to nematode infection: estimates of direct and correlated responses. *J. Anim. Sci.* v.70, p.17-27, 2000.

MORRIS, C.A. et al. Additive effects of two growth QTL on cattle chromosome 14. In: WORLD CONGRESS OF GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION v.7, p.19-23, 2002.

MOSIG, M. et al. A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion. *Genetics* v.157, p.1683-98, 2001.

NUTTALL, P.A. et al. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* v.28, n.4, p.155-163, 2006.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.* v.51, n.2, p.283-90, 1992.

PEREIRA, L.S. *Resposta imune do carrapato bovino Boophilus microplus: investigação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos hemócitos*. Dissertação de mestrado, 2000. Universidade de São Paulo.

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. *Queensland Agric. J.* v.108, n.6, p.279-300, 1982.

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

RIEK, R.F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* v.13, p.532-552, 1962.

RIQUET, J. et al. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Genetics* v.96, n.16, p.9252-9257, 1999.

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

RODRIGUES, M. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* v.57, p.339-349, 1995.

ROOS, M.H.; TIELENS, A.L.M. Differential expression of two succinate dehydrogenase subunit-B genes and a transition in energy metabolism in the development of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.66, p.273-281, 1994.

- ROOS, M.H. The role of drugs in the control of parasitic nematode infections: must we do without? *Parasitology* v.114, p.137-144, 1997.
- SAMISH, M.; REHACECK, J. Pathogens and predators of ticks and their potencial in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* v.44, p.159-182, 1999.
- SANTIAGO, A.A. *O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo*. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 745p., 1986.
- SCHMIDT, E.E.; SUAREZ, V.H.; CABARET, J. Nematode genera diversity in cattle: similarity of between-sire progenies. *Vet. Res.* v.29, p.139-148, 1998.
- SCHNABEL, R.D. et al. Whole-genome scan to detect QTL for milk production, conformation, fertility and functional traits in two US Holstein families. *Anim. Genet.* v.36, p.408-416, 2005.
- SEATON, G.; HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. *QTL Express*, 2002. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>.
- SEIFERT, G. W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust. J. Agric. Res.* v.22, p.159-168, 1971.
- SHER, A.; COFFMAN, R.I. Regulation of immunity to parasites by T cells and T-cell derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* v.10, p.385-409, 1992.
- SOLINAS-TOLDO, S.; LENGAUER, C.; FRIES, R. Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* v.27, p.489-496, 1995.
- SOLLER, M. Genetic mapping of the bovine genome using Deoxyribonucleic Acid-Level Markers to Identify Loci Affecting Quantitative Traits of Economic Importance. *J. Dairy Sci.* v.73, p.2628-2646, 1990.
- SONSTEGARD, T.S.; ROHRER, G.A.; SMITH, T.P.L. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Anim. Genet.* v.29, n.4, p.19-22, 1998.
- SONSTEGARD, T.S.; GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. *Vet. Parasitol.* v.101, p.387-403, 2001.
- STAFFORD, K.; COLES, G.C. Nematode control practices and anthelmintic resistance in dairy calves in the southwest of England. *Vet. Res.* v.144, p.659-661, 1999.
- TAMBASCO, D.D. *Similaridade genética multilocus entre parentais de bovinos e correlação com peso ao nascimento da progênie*. Dissertação de mestrado, 1998. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- TEODORO, R.L. et al. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. (compact disc) In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL. V.5. Pirassununga, 2004.
- THIESEN, W.L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: Seminário nacional sobre parasitose dos bovinos, I: 207-215, 1979.
- TUNIN, K.P. *Mapeamento de QTL para características de resistência a carrapato, peso ao nascimento e peso a desmama no cromossomo 23 de bovinos d geração F2, cruzamento Gir X Holandês*. Dissertação de mestrado, 2004. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- TURNER, H.G.; SHORT, A.J. Effects of field infestation of gastrointestinal helminthes and cattle tick (*Boophilus microplus*) on growth of three breeds of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* v.23, p.117-193, 1972.

- UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H. Breeding for resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman x Australian Illawarra Shorthorn cattle. *Aust. Vet. J.* v.58, p.41-46, 1982.
- UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, D.J. Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* v.29, n.4, p.885-95, 1978.
- VAN WYK, J.A. et al. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *J. Vet. Res.* v.66, p.273-284, 1999.
- VERMUNT, J.J.; WEST, D.M.; POMROY, W.E. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. *Vet. Res.* v.137, p.43-45, 1995.
- VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* v.143, p.1013-1020, 1996.
- WAGLAND, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. Response of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. *Aust. J. Agric. Res.* v.26, p.1073-1078, 1975.
- WALLER, P.J. The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. *Acta Tropica* v.55, p.233-243, 1994.
- WAMBURA, P. N. Breed-associated to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos Taurus*. *Vet. Parasitol.* v.77, p.63-70, 1998.
- WILLADSEN, P. et al. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* v.110, p.43-50, 1995.
- WILLADSEN, P. et al. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* v.18, p.241, 1996.
- WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. Today* v.15, p.258-262, 1999.
- WINDON, R.G. Resistance mechanisms in the *Trichostrongylus* selection flocks. In: GRAY, G.D.; WOOLASTON, R.R. Breeding for disease resistance in sheep. Melbourne: Australian Wool Corporation p.77-86, 1991.
- YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. Biology of babesia. *Parasitol. Today* v.2, p.211-219, 1986.
- ZADWORNÝ, D., KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain-reaction. *Theoretical and Applied Genetics* v.80, p.631-634, 1990.