

VIRGINIA DE SOUZA COLUMBIANO

**IDENTIFICAÇÃO DE QTL NOS CROMOSSOMOS 10, 11 E 12
ASSOCIADOS AO ESTRESSE CALÓRICO EM BOVINOS.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C726i
2007

Columbiano, Virginia de Souza, 1979-

Identificação de QTL nos cromossomos 10, 11 e 12 associados ao estresse calórico em bovinos / Virginia de Souza Columbiano. – Viçosa, MG, 2007.

ix, 49f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-49.

1. Bovino - Melhoramento genético. 2. Bovino - Fatores climáticos. 3. Locos de caracteres quantitativos. 4. Marcadores genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.20821

VIRGINIA DE SOUZA COLUMBIANO

**IDENTIFICAÇÃO DE QTL NOS CROMOSSOMOS 10, 11 E 12
ASSOCIADOS AO ESTRESSE CALÓRICO EM BOVINOS.**

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

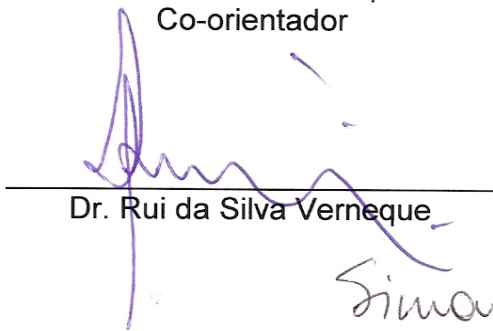
APROVADA: 19 de março de 2007



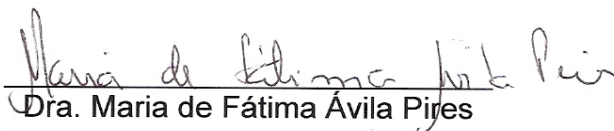
Prof. Paulo Sávio Lopes
Co-orientador



Dr. Marco Antônio Machado
Co-orientador



Dr. Rui da Silva Verneque



Dra. Maria de Fátima Ávila Pires



Profa. Simone Eliza Facioni Guimarães
Orientadora

Aos meus Pais Pedro e Graça.
Aos meus irmãos Jane e Dudu.
Ao Marcelo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia.

À Embrapa Gado de Leite.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À Professora Simone pela orientação, pelos muitos ensinamentos, pelo apoio, pelos conselhos e pela amizade nestes quatro anos de convivência agradável.

Aos Professores Paulo Sávio e Robledo pela orientação e ensinamentos ao longo dos cursos de Graduação e Mestrado.

Aos demais Professores da UFV por toda contribuição neste trabalho.

Aos funcionários da UFV por terem sido sempre tão prestativos.

Ao Dr. Marco Antônio Machado pela fundamental orientação, pelas oportunidades e pela paciência.

Ao Dr. Rui Verneque pela boa vontade e pelo tempo dispensado.

À Dra. Maria de Fátima pela indispensável ajuda e fornecimento de material.

Aos funcionários e estagiários do Campo experimental de Santa Mônica da Embrapa Gado de Leite pelo trabalho árduo nas coletas de dados.

À Dra. Marta e Ana Lúcia pelos ensinamentos e concessão de materiais.

Aos demais Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite pela fundamental contribuição neste trabalho.

À amiga Ana Luísa pela indispensável ajuda durante todas as etapas deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Vanessa, Michele, Gustavo, Robert, Brenda e Carla, pela ajuda fornecida em vários momentos e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV, Mário, Jane, Carlos, Kleibe, Débora, Isabela e Katiene pelas trocas de informações e pela amizade.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos meus pais, Pedro e Graça e aos meus irmãos Jane e Dudu por terem sempre acreditado em mim.

Ao meu noivo Marcelo pelo amor e pelo incentivo.

A todos aqueles que contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

Virginia de Souza Columbiano, filha de Pedro Demétrio Columbiano e Maria das Graças de Souza, natural de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, nasceu em 10 de setembro de 1979.

Em maio de 2001, iniciou o curso de Zootecnia, pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, onde foi bolsista de iniciação científica por dois anos, acompanhando e conduzindo pesquisas junto ao Programa de Melhoramento Genético de Aves e Suínos, atuando também na área de genética molecular do Departamento de Zootecnia da UFV.

Em julho de 2005, graduou-se em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em Agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Genética e melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, na área de Melhoramento Genético Animal.

Em 19 de março de 2007, submeteu-se ao exame final de defesa de tese para obtenção do título de Magister Scientiae em Genética e melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. Estresse Calórico em Bovinos.....	3
2.2. Parâmetros Fisiológicos.....	7
2.3. Mapeamento de QTL.....	11
2.4. Seleção Assistida por Marcadores.....	18
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Material Genético.....	21
3.2. Avaliação para Resistência ao estresse Calórico.....	21
3.3. Genotipagem com Marcadores Moleculares.....	26
3.4. Análises Estatísticas.....	28
4. Resultado e Discussão.....	30
5. Conclusões.....	45
6. Referências Bibliográficas.....	46

RESUMO

COLUMBIANO, Virginia de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2007. **Identificação de QTL nos cromossomos 10, 11 e 12 associados ao estresse calórico em bovinos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-orientadores: Paulo Sávio Lopes e Marco Antônio Machado.

O estresse calórico, especialmente nas regiões tropicais, consiste em uma importante fonte de perda econômica na pecuária, tendo efeito adverso sobre a produção de leite, produção de carne, fisiologia de produção, reprodução, mortalidade de bezerros e saúde do úbere. Estes efeitos podem ser amenizados utilizando-se a variação genética existente entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus* para as características associadas à resistência ao calor e os marcadores moleculares associados a esta resistência como um auxílio nos programas de melhoramento, visando a obtenção de animais termotolerantes e, conseqüentemente, mais produtivos. O desenvolvimento deste trabalho buscou mapear regiões genômicas nos cromossomos 10, 11 e 12 relacionadas à resistência ao estresse calórico em uma população F2 de bovinos (Holandês x Gir). As características avaliadas foram: diferença entre a temperatura retal antes e depois da exposição ao estresse calórico (DifTR), diferença entre a temperatura da pele antes e depois da exposição ao estresse calórico (DifTPele), diferença entre a freqüência de movimentos respiratórios antes e depois da exposição ao estresse calórico (DifMR), taxa de sudação após a exposição ao estresse calórico (TxSud), densidade do pêlo (DensidPêlo), comprimento do pêlo (CompPêlo), comprimento da capa (CompCapa) e espessura de capa (EspessCapa). Todas as medidas foram tomadas no verão e no inverno e os dados foram analisados desta forma. Um total de 17 *loci* microssatélites foram genotipados para 480 animais, sendo 31 parentais, 73 F1 e 376 F2. O resultado das análises de associação mostrou a existência de QTL ($p < 0,01$) para a característica CompPêlo localizado na posição 72 cM do cromossomo 10, com os dados coletados no verão. No cromossomo 11 foi encontrado um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para TxSud localizado a 0 cM, com os dados coletados no inverno. No cromossomo 12 foi encontrado também um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para a

característica CompPêlo localizado a 28 cM, porém, com os dados coletados no inverno. A estratégia da varredura genômica com marcadores microssatélites se mostrou adequada para a detecção de QTL para características de tolerância ao estresse calórico. Estas regiões mapeadas precisam ser refinadas com a adição de marcadores adicionais para um melhor entendimento do efeito de cada QTL e a identificação de genes candidatos responsáveis pela variação nestas características.

ABSTRACT

COLUMBIANO, Virginia de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, 2007, March. **QTL identification in bovine chromosomes 10, 11 and 12 associated with heat stress.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisers: Paulo Sávio Lopes and Marco Antônio Machado.

Heat stress impacts greatly animal production systems on tropical regions causing economical losses and affects milk production, meat production, physiology, reproduction, calf mortality and utter health. One way to reduce these losses is to use the genetic variation between *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds for heat tolerance coupled with linked molecular markers as an auxiliary tool in breeding programs to produce thermotolerant and more productive animals. This work aimed to map genomic regions related to heat stress on chromosomes 10, 11 and 12 in a F2 population derived from Holstein x Gyr crosses. The following traits were evaluated: variation of rectal temperature after heat stress (DifTR), variation of skin temperature after heat stress (DifTPele), variation on the rate of respiratory movements after heat stress (DifMR), sweating rate after heat stress (TxSud), fur density (DensidPêlo), fur length (CompPêlo), coat length (CompCapa) and coat thickness (EspessCapa). All traits were evaluated in two seasons (wet-warm and dry-cool) and analyzed separately. A total of 17 microsatellite loci were genotyped on 480 animals (31 parents, 73 F1 and 376 F2). Association analysis indicated a QTL ($p < 0,01$) for CompPêlo located at the position 72 cM on chromosome 10 for data collected on the wet-warm season. On chromosome 11 it was found an indication of QTL ($p < 0,05$) for TxSud located at the position 0 cM for data collected on the dry-cool season. On chromosome 12 it was also found an indication of QTL ($p < 0,05$) for CompPêlo located at the position 28 cM for data collected on the dry-cool season. The strategy of genome scan with microsatellite markers was shown to be effective to identify QTL regions related to heat tolerance traits. These mapped regions need to be refined with additional markers to better understand the QTL effects and to identify candidate genes responsible for the effects on these traits.

1. Introdução

A agropecuária brasileira é o setor mais competitivo da economia nacional, já que cerca de 20% da produção agropecuária é exportada e o setor agropecuário é o único setor da atividade econômica que tem superávit na relação de comércio internacional. A pecuária leiteira tem um importante papel nestes resultados favoráveis já que as exportações de carne bovina têm apresentado um crescimento expressivo nos últimos anos (www.cna.org.br). No ano de 2005 o país teve mais de 20 milhões de vacas ordenhadas, com uma produção de quase 25 bilhões de litros de leite por ano (www.agricultura.gov.br). Porém, uma fonte importante de perda econômica nesta atividade em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, é o estresse calórico, que tem efeito adverso sobre a produção de leite, produção de carne, fisiologia de produção, reprodução, mortalidade de bezerros e saúde do úbere (Silva, 2000).

O efeito das condições climáticas sobre o desempenho de vacas leiteiras é expressivo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, devido ao baixo potencial de produção de leite das raças zebuínas (*Bos indicus*) e à falta de adaptação das raças especializadas (*Bos taurus*) a estes climas (Machado e Martinez, 2001). Estas diferenças existentes entre as duas raças podem contribuir para a detecção de QTL ligados à resistência ao estresse calórico em bovinos (Hansen, 2004).

A variação genética existente entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus* para as características associadas à resistência ao calor e as atuais ferramentas da área genômica, sugerem a utilização de marcadores moleculares associados a esta resistência como auxílio aos programas de melhoramento visando à obtenção de animais termotolerantes e, conseqüentemente, mais produtivos. Para tanto, é necessária à formação de populações experimentais especialmente delineadas visando o mapeamento de regiões genômicas associadas a características de interesse ao melhoramento de bovinos (Machado e Martinez, 2001).

Os marcadores moleculares têm se destacado, na área genômica, na detecção de *loci* de características quantitativas (QTL) para utilização nos programas de seleção assistida por marcadores (MAS). Os mais utilizados são chamados microssatélites, que são pequenas seqüências repetidas de DNA de 1 a 6 pares de bases que estão distribuídos ao longo de todo o genoma e apresentam um padrão de herança mendeliana. O polimorfismo encontrado é devido a um número variável destas repetições que cada indivíduo possui e eles são os mais indicados para a detecção de QTL devido ao grande número existente, à posição conhecida no mapa e ao elevado índice de heterozigosidade (Machado e Martinez, 2001). A utilização de marcadores moleculares na MAS, proporcionará uma maior eficiência técnica e econômica dos sistemas de produção, porém, para que esta técnica possa ser aplicada comercialmente, é necessária a identificação e a caracterização de QTL no genoma, que estejam significativamente associados a caracteres de interesse (Martinez et al., 2000).

Não existem, entretanto, trabalhos associando regiões genômicas bovinas à resistência ao estresse calórico, havendo então a necessidade da realização de experimentos nesta área para que no futuro, estas informações obtidas possam auxiliar nos programas de melhoramento, mais especificamente, na Seleção Assistida por Marcadores (MAS).

Assim, buscou-se com este trabalho, identificar QTL nos cromossomos 10, 11 e 12, relacionados às características de resistência ao estresse calórico, em uma população F2 derivada do cruzamento entre duas raças divergentes de bovinos (Holandês x Gir).

2. Revisão de Literatura

2.1. Estresse Calórico em Bovinos

O clima tropical, geralmente é definido como uma região onde não há estação fria ou inverno, onde a temperatura ao nível do mar nunca fica abaixo de 18°C. A maioria dos países ditos subdesenvolvidos encontra-se na faixa intertropical, abrigando mais da metade da população mundial. A produtividade animal nesta área é muito baixa, comparativamente com o chamado primeiro mundo, sendo a média de produção de leite de 20% a 25% daquela considerada aceitável nos países de hemisfério norte. Em climas tropicais e subtropicais, os altos valores de temperatura e de umidade do ar têm se mostrado limitantes tanto ao desenvolvimento, quanto à produção e à reprodução, principalmente de animais com altos níveis de produtividade. Nos trópicos, o maior problema de desconforto é a eliminação do calor corporal para o ambiente (Campos, 2004).

Os bovinos são animais homeotermos, ou seja, são capazes de fazer a termorregulação, que é o processo de controle de temperatura em um sistema físico qualquer, consistindo em uma adaptação evolucionária que os permite viver em ambientes de temperaturas variadas. Esta habilidade também permite que a temperatura seja usada como um sinal de controle dos processos fisiológicos, já que, em um dado instante, o organismo está armazenando ou perdendo energia, a não ser que permaneça numa condição de trabalho invariável, num ambiente absolutamente inalterável. Sob tais condições ideais, o organismo entra em estado de equilíbrio térmico com o ambiente. Porém, a existência de equilíbrio térmico não é uma condição necessária nem suficiente para que haja equilíbrio de temperatura. Isto porque a temperatura em qualquer local do organismo será estável apenas se existir um equilíbrio na transferência de calor de e para este local (Kadzere, et al., 2002).

O estresse calórico é definido por Silva (2000) como a força exercida pelos componentes do ambiente térmico sobre um organismo, causando

nele uma reação fisiológica proporcional à intensidade da força aplicada e à capacidade do organismo em compensar os desvios causados pela força.

Segundo Kadzere, et al., (2002), para manter a homeotermia, um animal deve estar em equilíbrio com o ambiente, que inclui radiação, temperatura e movimento do ar e umidade.

Em ruminantes, ocorre uma produção maior de calor oriundo da digestão de alimentos contendo forragens quando comparados com animais que recebem alimentos ricos em concentrado (Guimarães et al., 2001), por este motivo, os ruminantes sob estresse de calor tendem a reduzir a ingestão de forragem volumosa em relação à de concentrado. O aumento na temperatura do ar também afeta a ingestão de água dos animais (Silva, 2000). Devido a isto, animais sob estresse calórico reduzem a ingestão de matéria seca voluntária em aproximadamente 25% na tentativa de minimizar a produção de calor. O aumento da frequência respiratória e da ofegação são mecanismos fisiológicos importantes para a dissipação de calor. No entanto, estes mecanismos demandam gasto de energia resultando no aumento da manutenção diária de bovinos de leite de 7 para 25%, o que resulta também em produção de calor (Kadzere, et al., 2002).

Existe uma zona de conforto térmico, chamada zona termoneutra, que pode ser entendida como a zona em que há uma produção mínima de calor endógeno e onde a temperatura retal está a níveis normais (Figura 1). Dentro desta faixa, normalmente são alcançados gastos fisiológicos mínimos e máxima produtividade. Geralmente o alcance da zona termoneutra depende de fatores como idade, espécie, ingestão de alimentos, composição da dieta, adaptação prévia, produção, habitação específica e condições de confinamento, isolamento de tecidos (gordura, pele), isolamento externo e do comportamento do animal (Kadzere, et al., 2002).

Um animal homeotérmico será capaz de manter relativamente estável sua temperatura interna, dentro dos limites estabelecidos de temperatura ambiente. Na Figura 1 estes limites são h_i e h_s , respectivamente.

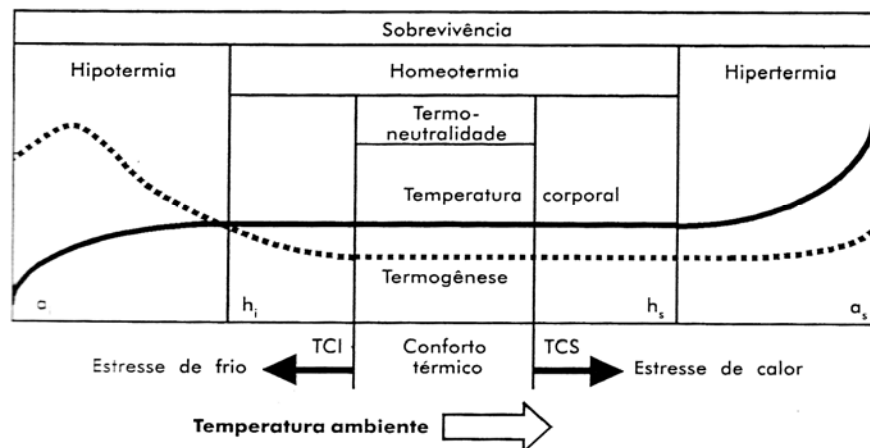


Figura 1: Esquema mostrando o relacionamento da taxa de temperatura corporal do animal, com a produção de calor e com a temperatura ambiental (Silva, 2000).

Para a produção de leite, estes limites estão entre 5°C e 21°C para vacas de raça Holandesa, sendo o limite superior ligeiramente maior para raças Jersey e Schwyz (24°C), e para as raças zebuínas (29°C) (Silva, 2000). Já de acordo com Campos, et al., (2004), as condições mais adequadas para a criação de animais europeus correspondem à média mensal inferior a 20° C em todos os meses e umidade relativa de 50 a 80%, em que se conclui que o gado europeu no Brasil deva ser criado em regiões que apresentem esta condição climática para que possam apresentar um bom nível de produção. Kadzere, et al., (2002), diz que o efeito negativo das condições climáticas sobre o desempenho de vacas leiteiras é expressivo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, causando redução na ingestão de alimentos pelos ruminantes e as variações no ambiente térmico induzem respostas fisiológicas específicas no sistema digestivo, como diminuição no fluxo sangüíneo para o rúmen, redução da mobilidade ruminal e da atividade ruminatória.

Pesquisas com gado de leite têm se concentrado em melhoramento genético para aumentar a produção e no fornecimento de nutrientes para vacas em lactação, mas pouca atenção tem sido dispensada à habilidade termorregulatória das vacas.

Srikandakumar e Jonhson, (2004), descreveram os efeitos do estresse calórico nas mudanças de produção de leite, temperatura retal e rítimo respiratório em vacas leiteiras. Eles verificaram que o estresse

calórico também modifica características do sangue, como pH, concentração de CO₂, HCO₃, bases, cloretos, concentração de hemoglobinas, saturação por oxigênio, concentração de potássio e cálcio, concentração de glicose, creatinina fosfoquinase, aspartato aminotransferase e uréia; sendo que as vacas de raça Holandesa e de raças Zebuínas produtoras de leite se mostraram mais capazes de manter o equilíbrio ácido-base em situações de estresse calórico do que outras raças.

A presença, numa população, de variantes genéticas com diferentes tolerâncias às variações de temperatura, por exemplo, permite uma utilização mais completa das oportunidades ambientais do que aquela que poderia ocorrer se houvesse um genótipo único (Hansen, 2004). Segundo Kadzere, et al., (2002), a espécie *Bos taurus* é menos adaptada aos climas tropicais e subtropicais quentes, que os *Bos indicus*. Paula-Lopes, et al., (2003), verificaram que, embora estas diferenças genéticas reflitam diferenças na termorregulação, células de raças termotolerantes são menos comprometidas pelo aumento da temperatura, do que células das raças termosensíveis. Os autores também constataram a existência de diferenças genéticas presentes na termotolerância de modo que as raças Brahman e Senepol são mais adaptadas a climas quentes do que Angus e Holandês. Isto é como se forças evolucionárias que dominam as raças Brahman e Senepol, as fizessem mais adaptadas ao clima quente resultando em uma seleção de genes controlando a resistência ao choque térmico celular.

Segundo estudos de Olson, et al., (2003), existem evidências que mostram a existência de um *Major Gene*, designado de *Slick Hair Gene*, dominante, que é responsável por produzir um pêlo muito curto e liso. Foi observado que bovinos com pêlos lisos possuem capacidade de manutenção da baixa temperatura retal. Existem indicações de que bezerros com pêlos lisos crescem rapidamente imediatamente após o desmame e que o seu crescimento durante os meses frios do ano não é comprometido significativamente pela reduzida quantidade de pêlos.

A fisiologia termorregulatória das vacas tem sido alterada em resposta à seleção genética para aumentar a produção de leite. E, apesar do aumento na produção de leite estar relacionado com o aumento da produção

de calor, o grau de aumento da produção de calor tem sido mais lento que o da produção de leite (Kadzere, et al., 2002).

2.2. Parâmetros Fisiológicos

2.2.1. Temperatura Retal

A manutenção da temperatura corporal é determinada pelo equilíbrio entre a perda e o ganho de calor, isto é, do equilíbrio entre o calor produzido pelo animal ou absorvido e o liberado para o ambiente. A referência fisiológica desta variável é obtida mediante a mensuração da temperatura retal. Esta medida é freqüentemente usada como índice de adaptabilidade fisiológica aos ambientes quentes, pois seu aumento mostra que os mecanismos de liberação de calor tomaram-se insuficientes para manter a homeotermia (Silva, 2000).

O calor necessário para manter a temperatura corporal dos animais deriva do metabolismo e da absorção da radiação solar, direta ou indireta, e a temperatura corporal depende do equilíbrio entre o calor produzido e o liberado para o ambiente. Fatores extrínsecos que podem atuar na variação da temperatura retal podem ser citados como: hora do dia, ingestão de alimentos e de água, estado nutricional, temperatura ambiente, densidade, sombreamento, velocidade dos ventos, estação do ano, exercício e radiação solar. Fatores intrínsecos estão relacionados com condição individual, como por exemplo, idade, raça, sexo e estado fisiológico (Carvalho, 1995).

A hipertermia normalmente ocorre com a elevação da temperatura ambiente no verão (Pires et al., 1998), no início da tarde, em construções abafadas e em pastos sem sombreamento (Lefcourt et al., 1993). Outro fator extrínseco importante na avaliação da temperatura retal é a capacidade de adaptação do animal ao ambiente. Zebuínos adaptados aos trópicos apresentam menores efeitos dos extremos de temperatura, se comparados aos Taurinos, adaptados aos climas temperados (Carvalho et al., 1995).

Animais *Bos taurus* nascidos no Brasil, apresentaram temperatura retal média de 38,9°C, enquanto animais *Bos taurus* importados, revelaram temperatura retal de 40,5°C, evidenciando adaptação dos animais ao ambiente (Carvalho et al., 1995).

2.2.2. Frequência Respiratória

A frequência respiratória também está sujeita às diversas variações provocadas por inúmeras causas. Alterações intrínsecas, caracterizadas por respostas individuais, como exercício físico, medo, excitação, estado fisiológico e produção de leite podem ser causas comuns em bovinos (Carvalho et al., 1995). Fatores ambientais, portanto extrínsecos, como condições climáticas, principalmente temperatura e umidade do ar, radiação solar, velocidade dos ventos, estação do ano, hora do dia e sombreamento podem afetar a frequência respiratória. Sob estresse calórico a frequência respiratória começa a elevar-se antes da temperatura retal (Pires et al., 1998).

A adaptação aos trópicos das raças zebuínas também faz com que estes animais apresentem melhores mecanismos termorregulatórios quando comparados com animais taurinos adaptados a climas temperados. Desta forma, animais *Bos indicus* nascidos no Brasil, apresentam média de 15 mov/min enquanto *Bos taurus* importados revelam frequência respiratória de 64 mov/min e os *Bos taurus* nascidos no Brasil apresentam frequência respiratória de 35 mov/min, evidenciando que os animais tendem a adaptar-se aos ambientes a que são submetidos também quanto aos parâmetros respiratórios (Carvalho et al., 1995).

2.2.3. Temperatura de Superfície Corporal

A pele é o maior órgão do corpo, sendo que sua principal função é a de proteção. Protege o organismo do calor e do frio e sua temperatura depende, principalmente, das condições ambiente, de umidade, temperatura e vento, e das condições fisiológicas, como a vascularização e a evaporação pelo suor. Assim, contribui para a manutenção da temperatura corporal mediante trocas de calor com o ambiente em temperaturas amenas. Os bovinos dissipam calor para o ambiente através da pele por radiação, condução e convecção, ou seja, ocorre a perda de calor sensível (Cunningham, 1999). Sob condições de estresse pelo calor, as perdas sensíveis são diminuídas e a evaporação torna-se o principal processo de perda de calor (Hansen, 2004).

2.2.4. Glândulas Sudoríparas

A pele tem papel fundamental no sistema termorregulatório dos animais domésticos. A evaporação é uma das formas mais importantes de dissipação de calor pelo aumento de temperatura corporal (ou em condições de estresse calórico) e pode contribuir com até 85% da perda evaporativa total de calor (Cunningham, 1999; Hansen, 2004).

A sudorese ocorre a partir de glândulas sudoríparas localizadas na derme. Nos bovinos a sudorese termorreguladora é promovida por um tipo denominado glândulas apócrinas e é a principal forma de perda de calor por evaporação. Este tipo de glândula perde parte do material citoplasmático durante a secreção. Elas são também epitríquias, pois estão sempre associadas a um folículo piloso (Silva, 2000). O suor excretado tem uma composição iônica semelhante à do plasma. À medida que passa para a superfície ao longo do ducto, sua composição se altera, devido à reabsorção de íons. Quando há pouca secreção, quase todo sódio e cloretos são absorvidos, seguidos pela água. Portanto, o suor que chega à superfície da pele é uma solução concentrada de uréia, potássio, ácido láctico e proteínas. Quando a secreção é abundante, há menor absorção de sódio e cloretos, maior perda de água e outros constituintes (Swenson e Reece, 1996).

Em ambientes quentes, a aclimação aumenta a sudorese, e devido a maior secreção de aldosterona, a maior parte de sódio e cloretos é reabsorvida antes que o suor chegue à pele (Cunningham, 1999). Vários pesquisadores têm estudado o papel das glândulas sudoríparas dos bovinos na termorregulação (Carvalho, et al., 1995).

Carvalho et al., (1995) Constataram uma possível variação entre raças, idade e mesmo individual, quanto à estrutura das glândulas sudoríparas (tamanho e forma), a profundidade e a sua densidade por unidade de área na pele. Eles observaram que bovinos *Bos indicus* possuem maior número de glândulas sudoríparas do que *Bos taurus*, tornando seu sistema evaporativo mais eficiente.

Existe uma correlação significativa entre o número de glândulas sudoríparas e o potencial de produção de leite. A atividade das glândulas sudoríparas também varia de acordo com a sua localização no corpo dos

animais. Existe também variação na capacidade de perda de suor pelos animais, de acordo com a região do corpo, relatando taxa de sudorese mais intensa na região do pescoço (Silva, 2000).

O aumento da temperatura ambiente também influencia na atividade das glândulas sudoríparas. O animal possui a habilidade de resistir ao aumento da temperatura corporal promovendo a perda de calor pela evaporação da água através da sudorese. Este é considerado um indicador de “adaptabilidade”. Carvalho et al. (1995) observaram que bovinos *Bos indicus* possuem um sistema evaporativo mais eficiente do que *Bos taurus*. O que torna os primeiros mais eficientes em perder calor, já que, segundo Hansen, (2004), 70-85% da perda de calor através da evaporação, é devido à sudação e o restante é devido à respiração.

2.2.5. Características do Pelame

As características do pelame dos bovinos estão associadas à sua capacidade de tolerância às variações climáticas do ambiente, sendo importantes na adaptação dos animais ao seu ambiente físico. O pelame dos bovinos apresenta alterações estacionais que ocorrem com grande regularidade e auxiliam o animal a preservar a termoneutralidade. Foi verificado que a espessura do pelame aumentava entre os meses de janeiro e setembro, caindo rapidamente no início do verão em vacas da raça Jersey. O coeficiente de herdabilidade estimado para esta característica foi igual a 0,23 (Silva, 1986).

Além do comprimento e densidade dos pêlos, a cor do pelame também uma característica importante envolvida no processo de tolerância ao calor. Os animais com superfície externa pigmentada e escura são mais sujeitos ao estresse pelo calor que os de coloração clara, apresentando maior capacidade de absorção da radiação solar, armazenando, assim, maior quantidade de energia térmica do que os animais que apresentam uma capa com coloração clara. Esta última apresentaria maior reflectividade, o que tem levado a maioria dos pesquisadores a aceitar a vantagem adaptativa dos pelames claros nos ambientes tropicais. O pelame branco apresenta maior penetração da radiação solar, sendo que a transmissão desta radiação pela capa depende das propriedades estruturais e físicas do

pelame (espessura da capa, comprimento, densidade, diâmetro e inclinação dos pêlos). A maior transmissão é proporcionada por pelames brancos, ao passo que os negros, em geral, apresentam transmissão muito baixa ou nula (Silva, 2000).

2.3. Mapeamento de QTL

Tradicionalmente, os melhoristas trabalham as características quantitativas pela seleção, usando predições de valores genéticos baseadas nas observações fenotípicas do próprio animal e, ou, de seus parentes. A genética quantitativa assume que as características quantitativas são controladas por um grande número de genes, cada um tendo um pequeno efeito. Paterson (1998b) comenta que uma mudança na teoria de “número virtualmente infinito de genes com pequenos efeitos” para “poucos genes com grandes efeitos” tem sido proposta, questionada, revisada, rejeitada e reconsiderada. Os geneticistas têm percebido que algumas pressuposições usadas para simplificar os modelos quantitativos, como igualdade dos efeitos dos genes e aditividade da ação gênica, eram pouco prováveis e mais precisamente descritas pelos *loci* de características quantitativas (QTL, do inglês, quantitative trait *loci*).

QTL são identificados como associações estatísticas significativas entre os valores genotípicos e a variabilidade fenotípica na progênie segregante (William, 1998). Segundo Liu (1998), QTL são genes localizados no genoma com efeitos genéticos aditivos, de dominância e, ou, epistáticos, significativos. O estabelecimento de mapas de ligação saturados tem sido o principal fundamento para a busca por QTL, o que tem ocorrido nos últimos anos. A procura por QTL é mais fácil em cruzamentos entre linhas endogâmicas com grandes diferenças fenotípicas, ou seja, linhas altamente divergentes (Lander e Botstein, 1989). Este tipo de cruzamento leva a uma grande segregação de QTL e marcadores na geração F2. Experimentos usando mapeamento de QTL são conduzidos visando três objetivos básicos: localizar genes responsáveis pela variação genética em fenótipos economicamente importantes, como ponto inicial para a seleção assistida por marcadores no melhoramento animal e vegetal; em longo prazo, realizar a clonagem molecular dos genes de fenótipos específicos; e responder

questões básicas sobre os processos evolutivos (Paterson, 1998b). O uso de marcadores genéticos para inferir sobre a arquitetura genética (número de genes, modos de expressão e efeitos relativos) é chamado de análise de QTL e reflete o interesse em descrever o *locus* gênico que contribui para a característica quantitativa (Liu, 1998).

O mapeamento de QTL é a detecção, a localização e a estimativa do efeito de regiões do genoma associadas a uma característica de herança quantitativa, que demanda grande número de animais com seu fenótipo de interesse determinado. Este número depende da magnitude do efeito que se deseja identificar, da herdabilidade da característica, do delineamento experimental escolhido, entre outros fatores. Este requisito é particularmente limitante em bovinos, que possuem custos de produção e manutenção bastante elevados (Regitano, 2004).

O poder de detecção do QTL é diretamente dependente das seguintes características: fração de recombinação entre o *locus* marcador e o *locus* do QTL, número de indivíduos informativos para o marcador (heterozigotos), herdabilidade da característica, tamanho do efeito do QTL, frequência dos alelos do QTL, e a significância estabelecida para o erro tipo I, que consiste na probabilidade de se aceitar uma hipótese falsa (Guimarães, 1999).

O desenvolvimento de um mapa de ligação saturado, que requer um grande número de marcadores moleculares, é um passo fundamental para a pesquisa em genômica. Os marcadores moleculares mais utilizados na área genômica são os chamados microssatélites, ou STRs (do inglês, Single Tandem Repeats), que são pequenas seqüências repetidas de DNA de 1 a 6 pares de bases e estão distribuídos ao longo de todo o genoma e apresentam um padrão de herança Mendeliano. O polimorfismo encontrado é devido à variação do número destas repetições que cada indivíduo possui. Os marcadores microssatélites são os mais indicados para a detecção de QTL devido ao grande número existente, à posição conhecida no mapa e ao elevado índice de heterozigosidade (Machado e Martinez, 2001). As repetições são, na maioria das vezes, de dois a dois, ou seja, dinucleotídeos. Estes marcadores podem estar localizados dentro ou

próximo de um gene, porém, a maioria deles está localizada em segmentos isolados de DNA.

A detecção de QTL requer três estágios essenciais: a coleta acurada de dados fenotípicos dentro da população desenvolvida; a coleta acurada dos dados de genótipo da população por meio de marcadores moleculares; e a análise estatística correlacionando os dados de genótipos refletindo a organização da população e sua estrutura. A reação de PCR é utilizada para a detecção do polimorfismo através das diferenças nos tamanhos dos produtos de amplificação submetidos à eletroforese, que pode ser em géis de agarose ou acrilamida, ou em equipamentos que fazem, automaticamente, análises de fragmentos de DNA.

Embora qualquer estrutura de população possa ser usada para mapear marcadores polimórficos, a escolha do delineamento a ser usado deve levar em consideração os aspectos biológicos, econômicos, genéticos e estatísticos. As considerações genéticas estão associadas com os parâmetros genéticos que se deseja estimar, por exemplo, o delineamento F2 permite estimar relações de dominância, já o retrocruzamento não. É muito importante que os progenitores sejam os mais heterozigotos e a progênie em maior número possível, permitindo assim traçar relações entre os marcadores polimórficos e as características de interesse detectáveis (Soller, 1978). Os delineamentos experimentais mais utilizados na detecção de QTL podem ser vistos na Figura 2.

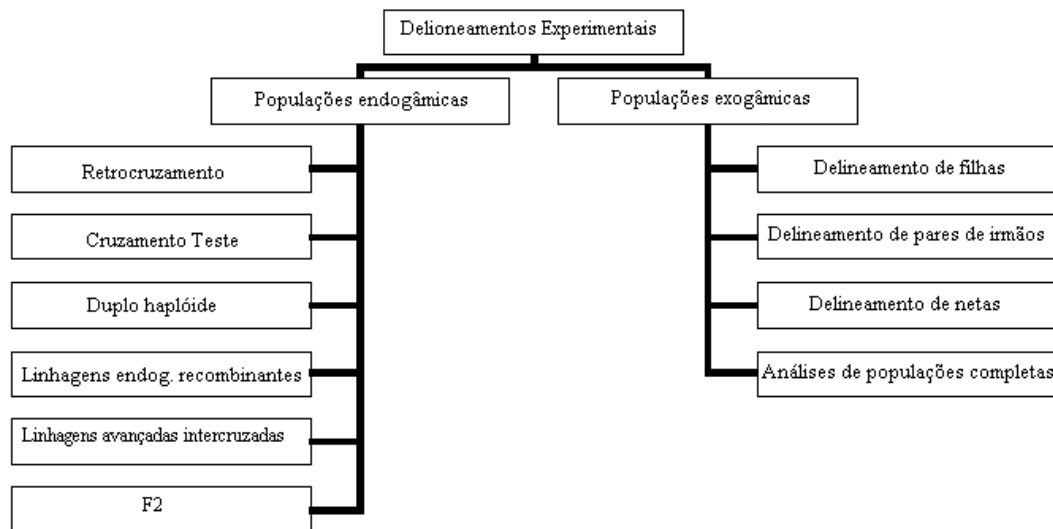


Figura 2: Delineamentos experimentais mais utilizados na detecção de QTL (Adaptado de Weller, 2001)

Todos os delineamentos experimentais possuem diversos elementos em comum. Assume-se que o suposto QTL é geneticamente ligado a um marcador, com a frequência de recombinação r . Assume-se também, a princípio, que somente dois alelos segregam na população, tanto para o marcador, M , quanto para o *loci* do QTL, Q . Os genótipos dos *loci* são denotados por M_1M_1 , M_1M_2 e M_2M_2 . Os genótipos do QTL são denotados por Q_1Q_1 , Q_1Q_2 e Q_2Q_2 , com efeitos esperados para a característica quantitativa de a , d e $-a$, respectivamente. Sendo os genótipos parentais: $M_1Q_1|M_1Q_1$ e $M_2Q_2|M_2Q_2$, se um indivíduo é heterozigoto para ambos os *loci*, metade de sua progênie receberá o alelo M_1 e metade o alelo M_2 . Assume-se que M e Q são ligados com frequência de recombinação igual. Deste modo, com exceção dos recombinantes, aquelas progênies que receberem M_1 também receberão Q_1 , enquanto aqueles indivíduos que receberem M_2 também receberão Q_2 . Assim, o efeito do QTL pode ser detectado pela comparação das médias de grupos de progênies que receberam alelos alternativos do pai heterozigoto. Os vários delineamentos experimentais diferem nos métodos usados para criar o pai heterozigoto para ambos os *loci* e cruzamentos executados (Weller, 2001).

Em geral, outras importantes pressuposições são assumidas nas análises, apesar de nem sempre serem rigorosamente observadas (Weller, 2001):

- Ambos os *loci*, M e Q, segregam de acordo com os princípios Mendelianos;
- A variância residual para a característica quantitativa apresenta distribuição normal;
- Não há seleção para os marcadores ou QTL;
- Apenas um único QTL é ligado a cada marcador ou par de marcadores;
- Os marcadores genéticos não possuem efeito pleiotrópico sobre as características quantitativas;
- Apenas dois alelos do QTL estão segregando na população;
- Não há interação entre os alelos do QTL (dominância);
- Não há interação entre o QTL e outro *loci* (epistasia);
- Não há interação entre o QTL e outros fatores não-genéticos;
- O QTL possui apenas efeito aditivo sobre a característica quantitativa.

Grandes famílias de meio-irmãos, freqüentemente utilizadas em rebanhos de bovinos leiteiros, ou mesmo populações experimentais F2, são comumente utilizadas para a geração de mapas de ligação. Um fator a ser considerado é o tamanho da população segregante, que deve ser o maior possível para possibilitar a presença do maior número de combinações genéticas. Por esta razão, o conjunto de famílias utilizado para o mapeamento do genoma bovino é constituído por um grande número de famílias de irmãos completos, produzidas por múltiplas ovulações com transferência de embriões (MOET - Multiple Ovulation and Embryo Transfer) (Bishop et al., 1994). Devido às novas técnicas de reprodução utilizadas atualmente nos rebanhos comerciais de gado leiteiro, já é possível conseguir grande número de progênies de um mesmo touro, tornando estes rebanhos muito úteis para o mapeamento de QTL.

O desenvolvimento de populações F2 (Figura 3) assim como os retrocruzamentos tem sido importante ferramenta na detecção de QTL, ambos utilizando progenitores que apresentam grandes diferenças fenotípicas. O cruzamento é feito entre duas populações que tenham se

fixado para diferentes alelos, ou estejam próximas da fixação, devido a pressões de seleção diferenciadas entre as duas populações. A produção de populações F2 em bovinos é bastante trabalhosa devido ao grande intervalo de gerações, a necessidade de gerar um grande número de fêmeas e ao custo para manutenção de toda a população. Porém este delineamento permite a identificação da origem dos alelos. Além disso, o delineamento F2 apresenta algumas vantagens sobre os demais, incluindo a capacidade de avaliar fenótipos importantes que normalmente não seriam avaliados (ex: temperamento e conversão alimentar). Este delineamento também possibilita a avaliação de valores produtivos de cruzamentos como uma alternativa para os rebanhos puros e permite o desenvolvimento de rebanhos experimentais que eventualmente podem ser utilizados comercialmente aumentando assim sua utilização entre os criadores (Van Tassel et al., 2001).

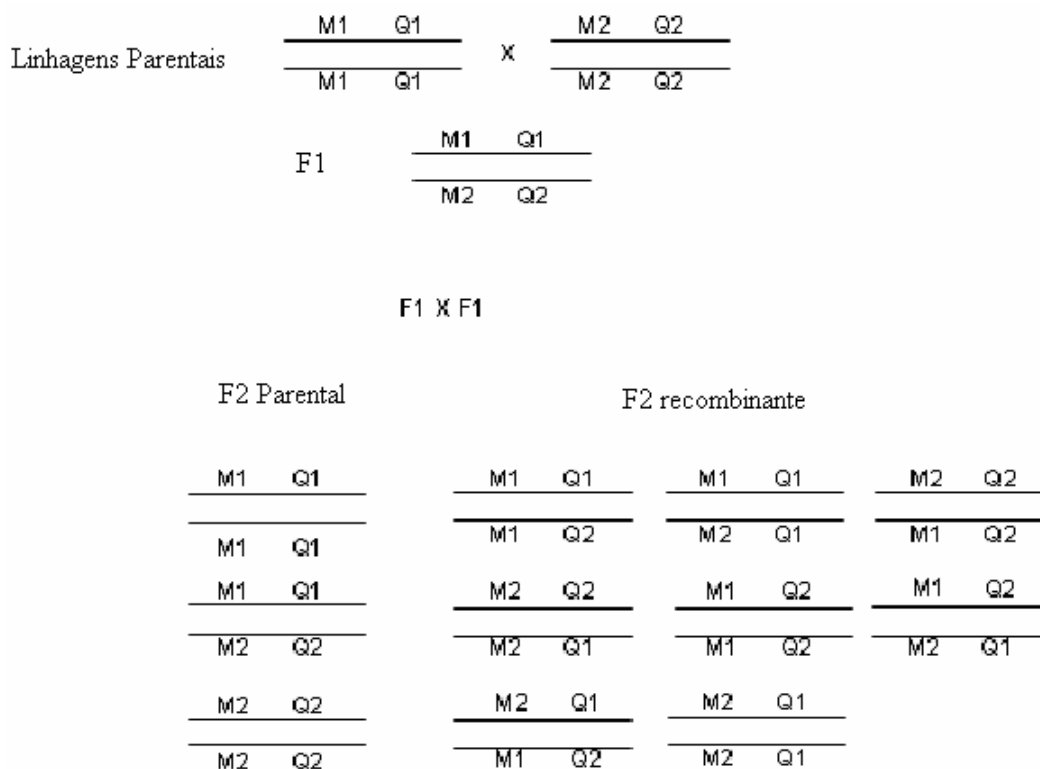


Figura 3: Esquema do delineamento F2 utilizado para execução do experimento

O delineamento experimental F2 promove o desequilíbrio de ligação necessário para a identificação de QTL quando são cruzadas duas subespécies, como por exemplo, *Bos taurus* e *Bos indicus*. Este delineamento é o que oferece melhor poder de detecção em relação ao número de animais disponíveis, quando este número não é tão expressivo. Por este delineamento também é possível a separação de efeito aditivo e de dominância dos QTL encontrados.

O primeiro passo para a obtenção desta população é cruzar duas linhagens divergentes para produzir a progênie heterozigota F1. Depois disso, a população F2 é obtida pelo cruzamento dos indivíduos F1, resultantes do cruzamento entre genitores homozigóticos. No mapeamento de QTL a disponibilidade de informações dos três genótipos (AA, Aa e aa) aumenta a precisão da estimativa dos componentes genéticos (Weller, 2001):

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

Os QTL detectados em populações comerciais normalmente correspondem a fenótipos relacionados a características produtivas, características de conformação ou saúde. Normalmente, as populações utilizadas são grandes famílias de meio-irmãos geradas a partir do uso extensivo da inseminação artificial utilizada nos testes de progênie. Os experimentos para detecção de QTL a partir de populações experimentais F2 ou retrocruzamentos ocorrem em uma frequência menor. Esta diferença pode ser devido ao elevado custo para gerar, manter e fenotipar grandes populações. Entretanto, os diferentes delineamentos experimentais fornecem maior oportunidade de detectar QTL para crescimento, carcaça,

qualidade da carne, taxa de ovulação e resistência a parasitos. Algumas destas características apresentam baixa herdabilidade ou são difíceis ou muito dispendiosas de serem mensuradas em populações comerciais (Sonstegard et al., 2004).

Os primeiros mapas genéticos de bovinos foram elaborados em 1994 (Bishop et al., 1994). Um mapa mais saturado, de segunda geração, com 1.425 marcadores, foi produzido em 1997 (Kappes et al., 1997; <http://sol.marc.usda.gov>). Em 2004, um novo mapa com 3.802 microssatélites foi publicado por Ihara et al. (2004).

A detecção de QTL em populações comerciais é dificultada pelos efeitos de ambiente e de epistasia. Devido a esta complexidade, diversas estratégias experimentais e ferramentas estatísticas vêm sendo desenvolvidas para maximizar a probabilidade de detecção de QTL (Liu, 1998). Sabendo-se que a característica é herdada, a detecção de QTL pode ser feita pela varredura genômica. Isto envolve a seleção de uma população que esteja segregando para as características de interesse e a genotipagem da mesma com marcadores polimórficos distribuídos ao longo de todos os cromossomos. Métodos estatísticos como análise de variância e máxima verossimilhança são usados para determinar se um marcador está associado com alguma característica fenotípica (Beckmann et al., 1988; Lander et al., 1989).

2.4. Seleção Assistida por Marcadores

O melhoramento genético é uma alternativa eficiente e barata para a obtenção de animais mais tolerantes ao estresse calórico, além de possuir caráter permanente e não provocar danos ao ambiente. Atualmente, a ferramenta preferida na exploração das informações a respeito de características de interesse econômico é a seleção assistida por marcadores (MAS) e muitas empresas comerciais de melhoramento animal estão começando a implementar a MAS em programas de melhoramento de rebanhos (Georges, 2001).

A informação direta do DNA pode ajudar a fixar um alelo específico de um gene de grande efeito. Pode também ser usada para assistir à seleção de características quantitativas, incluindo aquelas que podem ser

selecionadas por meios tradicionais. A informação molecular pode aumentar a acurácia da seleção e, portanto, a resposta à seleção. Assim, a identificação de genes influenciando características economicamente importantes seguida pela MAS, pode ser empregada em conjunto com métodos tradicionais de seleção para acelerar o ganho genético no melhoramento destas características (Plastow, 2000). O tamanho desta resposta extra em esquemas de seleção assistida por marcadores (MAS) tem sido considerado em muitos estudos teóricos. Em geral, MAS é mais benéfica para características com baixa herdabilidade, limitadas pelo sexo ou ainda características difíceis de serem mensuradas fenotipicamente (Martinez, 2000).

Meuwissen e Goddard (1996) estudaram o impacto da MAS em características de qualidade de carne e reprodutivas, em que é difícil de se obter progresso usando métodos tradicionais, e mostraram que para características de qualidade de carne, que são medidas após o abate, pode-se obter uma resposta adicional acima de 64%. O uso da MAS, no entanto, requer desequilíbrio de ligação, seja na família ou na população (Fairfull, 1997).

Martinez et al., (2000) citam ainda outras inúmeras vantagens que a MAS pode trazer aos melhoristas, como o fato de touros jovens poderem ser selecionados, para marcadores específicos, logo após o nascimento. Desta maneira, os animais de alto mérito genético são mantidos no programa, enquanto os animais de baixo mérito genético podem ser descartados, evitando o custo de manutenção destes animais por vários anos. Com a seleção assistida por marcadores, é possível ainda, combinar QTL de duas ou mais raças em um único animal que irá possuir todas as características combinadas.

Apesar das vantagens que a seleção assistida por marcadores possibilita, é aconselhável que ela seja realizada conjuntamente com a seleção fenotípica, visando minimizar a chance de descarte de um animal que possua alto potencial genético, devido à possível associação inconsistente entre marcador e característica fenotípica. Quando a MAS é comparada à seleção com base no fenótipo, pode ser mais precisa pois não sofre efeito do meio ambiente, não é limitada a um sexo e não requer testes

caros ou que destruam o indivíduo. A MAS pode ser realizada bem cedo na vida do indivíduo, reduzindo o intervalo entre gerações e ainda pode incluir todos os indivíduos, mesmo aqueles que ainda não nasceram, por meio da análise do genótipo do embrião e, assim, aumentar a intensidade de seleção (Machado e Martinez, 2001). A MAS pode também permitir a identificação e a rápida introgressão de alguns poucos alelos de QTL de raças melhoradas que aumentem a produção em raças nativas adaptadas, ou para transferência de um *loci* específico associado à resistência das raças adaptadas ou nativas para as raças melhoradas (Beckmann e Soller, 1987).

A utilização de marcadores moleculares proporcionará uma maior eficiência técnica e econômica dos sistemas de produção, porém, para que a MAS possa ser aplicada comercialmente, é necessária a identificação e a caracterização de QTL no genoma, que estejam significativamente associados a caracteres de interesse.

3. Material e Métodos

3.1. *Material Genético*

Foram utilizados animais pertencentes à Embrapa Gado de Leite. A população formada foi baseada no delineamento experimental F2 utilizando o cruzamento entre animais das raças Holandesa e Gir. Esta população pertence ao projeto de mapeamento do genoma bovino, ainda em andamento na Empresa. Ele visa detectar QTL e, posteriormente, genes que possam estar presentes na região do QTL, relacionados com características de importância econômica.

Vinte e sete fêmeas Gir pertencentes à Embrapa foram inseminadas com sêmen importado de quatro touros de raça Holandesa, produzindo 150 indivíduos F1. Foram utilizadas, para a formação desta população, as técnicas de inseminação artificial e múltipla ovulação com transferência de embriões (MOET). Dos 150 animais F1, apenas cinco machos foram escolhidos para formarem a geração de F2. Sessenta e sete fêmeas F1 foram escolhidas e cada uma delas foi acasalada com um dos cinco touros, para constituírem cinco famílias, evitando-se parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. Cada uma das famílias produziu, por meio da técnica MOET, aproximadamente 80 animais F2. Até o momento da elaboração deste trabalho, havia sido extraído material genético de 376 indivíduos F2, estando dentro do recomendado por Beckman e Soller (1988) para se ter sucesso na detecção de ligação entre o marcador molecular e o QTL.

3.2. *Avaliação para Resistência ao Estresse Calórico*

3.2.1. *Local do Experimento*

O trabalho experimental foi realizado no Campo Experimental Santa Mônica (CESM), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizada no distrito de Barão de Juparanã, município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, situado a 22°21' de latitude sul e 43°42' de longitude oeste, a uma altitude

média de 364m. Parte do experimento utilizou uma câmara climática com controle de temperatura e umidade relativa do ar, com capacidade para cinco animais.

3.2.2. Animais

Foram utilizados 315 animais da geração F2 em cada estação, para as análises de resistência ao estresse calórico. Os animais foram avaliados em lotes formados com idade entre 14 e 20 meses. Eles permaneceram em piquetes com *Brachiária decumbens* contendo cocho para sal mineral e água, sendo seus fornecimentos *ad libitum*. Durante o período de alocação dos animais dentro da câmara climática, estes eram trazidos dos piquetes no dia anterior a avaliação e colocados em local próximo à câmara bioclimática.

No período em que os animais permaneceram dentro da câmara climática, não foram fornecidos água ou alimentos para reduzir seus efeitos nas respostas fisiológicas. Estas condições foram citadas por McDowell (1972) como adequadas, por permitir uma resposta mensurável para todos os animais. Este manejo foi repetido com intervalo de aproximadamente seis meses, focalizando-se as estações de verão e inverno.

3.2.3. Coleta de Dados

As coletas de dados foram realizadas em duas etapas, fora e dentro da câmara climática, e em duas épocas do ano: inverno e verão. Para a avaliação de todos os animais nos dois períodos, foi necessário um intervalo de cerca de um ano.

Na tarde anterior ao dia da avaliação, os animais eram alocados na câmara climática (Fig. 4) em condições de termoneutralidade (temperatura de 22°C e 70% de umidade relativa), onde permaneceram por um período de 12 horas.



Figura 4: Câmara climática utilizada para avaliação dos animais

Na manhã do dia da avaliação (6:00 h), em condição de termoneutralidade, os dados foram coletados seguindo-se o esquema descrito na Tabela 1. Após as coletas, os equipamentos eram ajustados modificando-se a temperatura para 42°C e 60% de umidade relativa. A temperatura e a umidade do ar dentro da sala foram registradas colocando-se termômetro de bulbo seco e de bulbo úmido e termômetro de globo negro em três pontos distintos dentro da câmara, para caracterizar o ambiente térmico dentro da sala durante o período experimental. O primeiro ponto se localizava perto da porta, o segundo próximo ao cocho e o terceiro no fundo da sala. Quando os termômetros atingiam os valores pré-determinados (10:00 horas), iniciava-se a contagem do tempo para que os animais permanecessem por um período de seis horas. Após as seis horas de permanência, procedia-se a segunda coleta, referente à condição de estresse.

Tabela 1: Esquema de execução das coletas dos dados fenotípicos fora e dentro da câmara climática.

Antes da avaliação	Manhã	Tarde
Tarde do dia anterior (18:00h)	Manhã do dia da avaliação (6:00h)	Tarde do dia da avaliação (16:00h)
<ul style="list-style-type: none"> • Alocação dos animais dentro da câmara climática. • Acionamento dos equipamentos. • Verificação dos equipamentos. • Câmara climática ajustada para temperatura de 22°C e 70% de umidade relativa. • Permanência dos animais por 12 horas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verificação dos equipamentos • Contenção dos animais. • Temperatura retal coletador 1. • Temperatura de superfície corporal. • Temperatura retal Coletador 2. • Frequência respiratória Coletadores 1 e 2. • Acionamento dos equipamentos. • Verificação dos equipamentos. <hr/> <p style="text-align: center;">Câmara climática (10:00h)</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> • Verificação dos equipamentos. • Câmara climática com temperatura de 42°C e 60% de umidade relativa. • Permanência dos animais por 6 horas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verificação dos equipamentos. • Contenção dos animais. • Temperatura retal coletador 1. • Temperatura de superfície corporal. • Temperatura retal coletador 2. • Taxa de sudação. • Frequência respiratória coletadores 1 e 2. • Verificação dos equipamentos. • Equipamentos desligados.

3.2.4. Características fisiológicas mensuradas

As características avaliadas foram diferença entre a temperatura retal antes e depois da submissão ao estresse (DifTR), diferença entre a temperatura da pele antes e depois da submissão ao estresse (DifTPele), diferença entre a taxa de movimentos respiratórios antes e depois da submissão ao estresse (DifMR), taxa de sudação (TxSud), comprimento do pêlo (CompPêlo), densidade dos pêlos (DensidPêlo), espessura da capa (EspessCapa) e comprimento da capa (CompCapa).

A temperatura retal, a taxa de movimentos respiratórios e a temperatura da superfície corporal de todos os animais foram mensuradas nos períodos da manhã (antes da submissão ao estresse calórico) e da tarde (após a submissão ao estresse calórico). A temperatura retal e o movimento respiratório foram mensurados por dois examinadores distintos e as respectivas médias foram consideradas. A temperatura retal foi obtida com o auxílio de um termômetro clínico digital inserido, aproximadamente, 5

cm no reto. A frequência respiratória foi mensurada pela contagem dos movimentos do flanco cronometrados por um período de 15 segundos e a média multiplicada por 4 para se obter o valor em 1 minuto. A temperatura de superfície corporal foi mensurada em quatro pontos do corpo do animal: cabeça, cernelha, virilha e canela, utilizando-se termômetro infravermelho, obtendo-se no final a média dos quatro pontos por animal.

A taxa de sudorese dos animais foi coletada apenas no período da tarde, logo após as medidas finais dos índices fisiológicos, pelo método de cloreto de cobalto modificado por Schleger e Turner (1965). Esta variável foi mensurada com o auxílio de cronômetro digital e realizada sempre pelos mesmos examinadores por se tratar da avaliação subjetiva da viragem de cor das esferas embebidas em cloreto de cobalto, de azul para rosa. A técnica de preparo das esferas para a posterior utilização na mensuração da taxa de sudorese consiste em: depilar uma região do animal de 4 X 3 cm; limpar com álcool e secar com papel; limpar com éter e secar com papel; fixar na pele do animal três discos previamente imersos em cloreto de cobalto hexahidratado a 10% e secos em estufa a 90°C até que os discos mudem suas cores de rosa para azul; cronometrar o tempo em segundos que cada disco leva para voltar à cor rosa e fazer a média dos três valores. De acordo com Silva (2000), a taxa de sudação pode ser calculada a partir da fórmula:

$$TS (g/m^2/h) = 38446,6019 / \text{Tempo de mudança da cor em segundos}$$

Na tarde anterior ao dia da coleta de dados, os animais foram classificados de acordo com a coloração e o tipo de pêlo. Foi dada uma nota de 1 a 6 de acordo com a coloração da pelagem, onde os valores mais baixos indicam pelagem mais clara (vermelho ou amarelo claro) e valores mais altos, pelagem mais escura (preto ou vermelho escuro). Os pêlos também foram classificados em lisos ou lanados, variando de 1 a 6, onde os valores mais baixos indicam animais de pêlos mais lisos e valores maiores, animais de pêlos lanados. Foi medida, também, a espessura da capa externa, com o auxílio de paquímetro de precisão, em três locais diferentes do corpo dos animais. Esta medida consiste na medida da espessura da capa com os pêlos acamados naturalmente. Foi medido também o

comprimento da capa, que consiste no comprimento do pêlo ainda inserido na pele do animal.

Após esta mensuração, foram obtidas amostras do pêlo com o auxílio de um alicate, segundo o método descrito por Lee (1953). Esta amostra, obtida nos mesmos locais onde foi medida as espessuras da capa, foram armazenadas em envelopes de plástico, para posterior contagem e mensuração do comprimento dos pêlos e da densidade dos mesmos, calculada a partir do número de pêlos e da área de onde eles foram extraídos.

3.3. Genotipagem com Marcadores Moleculares

Amostras de sangue de todos os animais: progenitores das raças Gir e Holandesa, progenitores F1 e animais F2, foram coletadas para a extração de DNA. No caso dos quatro touros progenitores de raça Holandesa, o DNA foi extraído a partir do sêmen, tendo-se em vista que o sêmen foi importado. Nos demais animais, o DNA foi extraído de amostras de sangue de aproximadamente 10 ml, com 0,5% EDTA, que, após passarem por um período de descanso de, no mínimo uma noite a 4°C, foram centrifugadas, sendo retirado o anel de células brancas. As células do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado e o resíduo celular peletizado por centrifugação. A desintegração foi repetida três vezes ou até a obtenção de um precipitado branco, que foi ressuscitado num tampão de digestão contendo 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,02% SDS, com 0,2 mg proteinase K por amostra, e incubado a 50°C até o dia seguinte. As proteínas foram extraídas duas vezes em fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1, duas vezes em clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1, e então precipitadas com acetato de sódio e etanol. O DNA foi solubilizado em tampão de extração TE, que consiste em 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, e congelado até a hora do uso. Um protocolo semelhante, apenas omitindo o passo de desintegração das células vermelhas foi utilizado para a extração de DNA do sêmen.

Para a varredura do genoma, foram utilizados marcadores microssatélites escolhidos do mapa consenso disponibilizado pelo

MARC/USDA (*Meat Animal Research Center/ United States Department of Agriculture*), no endereço: <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>. A escolha foi baseada na sua posição no mapa, com distância entre marcadores em torno de 20 cM, multi-alelismo e mínimo de 50% de heteroziguidade. Ao todo, foram selecionados 17 marcadores microssatélites, visando cobrir os cromossomos 10, 11 e 12.

Estes marcadores selecionados foram utilizados para a genotipagem de 104 animais parentais e F1 e 376 animais F2. Para cada primer, foram testadas três concentrações de MgCl₂ (1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM) e pelo menos quatro temperaturas de anelamento (TA). As reações constaram basicamente de 45ng de DNA genômico; 0,2mM de dNTPs; MgCl₂ definido individualmente; 20mM TRIS pH 8,3; 50mM KCl e 0,1 μM de *primer* num volume total de 10μL. Os *primers forward* foram marcados com três tipos de fluorescência (TAMRA, HEX e FAM) objetivando a montagem de multiplex durante as análises automáticas. As amplificações foram realizadas em termociclador automático e contaram com as seguintes etapas: 94°C (30 seg), TA (30 seg), 72°C (30 seg) durante 35 ciclos e uma etapa final para extensão de 45 min a 72°C.

Todas as reações de PCR foram precipitadas utilizando 1 μL de Acetato de Amônia (7,5M) e 30μL de etanol 90%. As placas foram então centrifugadas durante 30 min. Logo após, o etanol foi descartado e foram adicionados 30 μL de Etanol 70%, que foram também descartados. O DNA final foi ressuspendido em 20μL de água.

Os produtos das amplificações foram detectados por eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os genótipos foram analisados no programa Fragment Profiler (GE Healthcare). Os genótipos para os marcadores microssatélites foram exportados para uma planilha no Programa Excel (Microsoft Corporation).

3.4. Análises Estatísticas

Foi realizada uma análise da distribuição dos valores fenotípicos avaliados para verificar se as mesmas seguem a distribuição normal, utilizando o programa Jump (SAS System).

Foram realizados cálculos da heterozigosidade (H) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) no programa Cervus v.2.0 (Marshall et al., 1998), de acordo com as seguintes expressões:

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

em que: K_i é o número de observações do alelo i ($i=1, \dots, n$), N é o número total de informações ($2n$ alelos) e p_i e p_j são as informações de frequência dos alelos i e j .

Um mapa de ligação para cada um dos três cromossomos estudados foi gerado utilizando o programa CRIMAP disponível em <http://compngen.rutgers.edu/multimap/crimap/index.html>. Estes mapas foram utilizados nas análises de busca por QTL que foram realizadas pelo programa QTLEXPRESS disponível no endereço: <http://qtl.cap.ed.ac.uk> (Seaton et al., 2002), que emprega o método de regressão por intervalo de mapeamento, desenvolvido para análises de cruzamentos entre raças divergentes. No modelo estatístico, assume-se que o QTL é dialélico, com alelos alternativos fixados em cada raça parental (Haley et al., 1994). Neste caso, como a linha 1, consiste nos animais de raça Holandesa e a linha 2, consiste nos animais de raça Gir, considerou-se o genótipo QQ para os animais de raça Holandesa, com efeito "a", qq para os animais Gir, com efeito "-a", e Qq para os animais F1, com efeito "d". A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada condicionalmente aos marcadores, a intervalos de 1 cM ao longo do cromossomo. Essas probabilidades são usadas para se fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL em estudo para cada animal. Os valores da razão F foram plotados e os pontos com os maiores valores para a estatística do teste foram apresentados como

a possível posição do QTL. Os níveis de significância ($\alpha = 5\%$ ou 1%) ao longo do cromossomo foram obtidos utilizando-se um total de 10000 permutações para cada característica. O teste de permutação foi executado pelo programa QTL Express (Seaton et al., 2002). O modelo incluiu os efeitos aditivo e de dominância.

Para todas as variáveis, utilizou-se como efeito fixo, sexo do animal, tipo de pêlo e cor da pelagem e como co-variável, idade à mensuração. Todas as características foram avaliadas separadamente para os dados mensurados no verão e no inverno.

O modelo utilizado pelo QTLEXPRESS foi:

$$y_{ijkl} = S_i + C_j + T_k + b(ID_{ijkl} - \overline{ID}) + c_a a + c_d d + e_{ijkl}$$

Sendo,

Y_{ijkl} = valor observado na característica no animal l , com sexo i , cor do pêlo j e tipo de pêlo k ;

S_i = efeito fixo do sexo i , $i = 1, 2$;

C_j = efeito fixo da cor do pêlo j , $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$;

T_k = efeito fixo do tipo de pêlo K , $K = 1, 2, 3, 4, 5, 6$;

$b(ID_{ijkl} - \overline{ID})$ = ajustamento para a covariável (idade à mensuração);

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

Onde,

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

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

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

E_{ijkl} = erro;

l = animal.

4. Resultados e Discussão

Os dados fenotípicos foram coletados no inverno e no verão, sendo considerado verão o período entre novembro de certo ano e abril do ano seguinte, e inverno, o período entre maio e outubro do mesmo ano. As análises foram então divididas em dois grupos, de acordo com a estação. As médias para as características avaliadas, seus respectivos desvios padrão, valores máximos e mínimos estão descritos na Tabela 2.

O programa QTLexpress pressupõe, para as análises de QTL, que a característica a ser testada seja normalmente distribuída. Por isso, foram realizados testes para distribuição normal utilizando o programa Jump (*SAS System*), sendo as análises separadas em verão e inverno. As características mostraram-se normalmente distribuídas, possibilitando que as análises fossem feitas corretamente.

Os 17 marcadores selecionados cobriram os três cromossomos estudados, com intervalos de 21, 17 e 33 cM, respectivamente para os cromossomos 10, 11 e 12. Para o cromossomo bovino 10 foram utilizados cinco marcadores e para os cromossomos 11 e 12 foram utilizados 6 marcadores para cada um, representados na Tabela 3, juntamente com as distâncias em cM entre cada marcador, baseada no mapa do MARC/USDA e no mapa gerado pelo programa CriMap baseado na população estudada. As distâncias encontradas entre os marcadores, utilizando o programa CriMap não foram discrepantes das fornecidas pelo MARC/USDA, exceto para o cromossomo 12. O tamanho em cM encontrado para o cromossomo 10 foi 27% maior que o consenso, já o cromossomo 11, foi apenas 2,3% menor que o consenso, e o cromossomo 12, foi 86% maior que o mapa consenso provavelmente devido ao fato deste cromossomo possuir os marcadores de maiores percentuais de falhas de genotipagem (Tabela 3). Porém, a ordem dos marcadores no mapa não foi alterada. Existem mapas de ligação disponíveis no site do MARC/USDA para BTA 12, variando de 45

até 125cM, o que mostra a variação de resultados encontrados nos diferentes trabalhos.

Tabela 2: Média, desvio padrão fenotípico, valores máximos e mínimos para cada característica avaliada, no verão e no inverno.

Características	Média	Desvio Padrão	Valor Máx.	Valor Mín.
Temperatura retal verão (°C)	38,06	0,48	39,40	33,25
Temperatura retal inverno (°C)	38,10	0,96	39,30	23,25
DifTR verão (°C)	2,66	0,79	5,40	0,60
DifTR inverno (°C)	2,04	0,62	3,80	0,40
Mov. Respiratórios/min verão	17,50	5,20	44	8
Mov. Respiratórios/min inverno	16,81	4,30	46	8
DifMR verão	103,49	23,58	158	24
DifMR inverno	87,94	29,35	154	6
Temperatura da pele verão (°C)	27,16	2,16	32,25	20,55
Temperatura da pele inverno (°C)	29,06	2,43	50,85	24,40
DifTPele verão (°C)	16,11	4,32	23,75	6,40
DifTPele inverno (°C)	14,05	4,63	24,47	6,15
TxSud verão (g/m ² /h)	268,56	115,48	651,64	66,52
TxSud inverno (g/m ² /h)	280,79	117,18	640,78	45,82
CompPêlo verão (cm)	1,04	0,25	2,63	0,56
CompPêlo inverno (cm)	1,75	0,38	3,29	0,77
EspessCapa verão (mm)	4,80	1,18	12,33	0,83
EspessCapa inverno (mm)	4,88	1,11	8,50	1,20
CompCapa verão (cm)	1,07	0,28	2,27	0,53
CompCapa inverno (cm)	1,42	0,36	2,70	0,57
DensidPêlo verão (cm ³)	173,34	51,84	412,00	67,67
DensidPêlo inverno (cm ³)	163,13	52,71	332,67	70,00

Temperatura retal = temperatura retal em condição de termoneutralidade, DifTR = diferença entre a temperatura retal antes e depois da submissão ao estresse, mov. respiratório/min = taxa de movimentos respiratórios por minuto em condição de termoneutralidade, DifMR = diferença entre a taxa de movimentos respiratória antes e depois da submissão ao estresse, Temperatura da pele = temperatura da pele em condição de termoneutralidade, DifTPele = diferença entre a temperatura da pele antes e depois da submissão ao estresse, TxSud = taxa de sudorese, CompPêlo = comprimento do pêlo, DensidPêlo = densidade dos pêlos, EspessCapa = espessura da capa e CompCapa = comprimento da capa.

Tabela 3: Distância entre cada marcador representada em cM, baseado no mapa gerado para a população em estudo e no mapa do MARC/USDA.

Código de trabalho	F2		MARC/USDA	
	Distância entre os marcadores (cM)	Posição (cM)	Distância entre os marcadores (cM)*	Posição (cM)*
10-1	0,00	0,00	0,00	24,70
10-2	9,80	9,80	6,92	31,62
10-3	23,80	33,60	22,28	53,90
10-4	38,70	72,30	25,11	79,01
10-5	35,50	107,80	30,39	109,39
BTA 10	107,80	107,80	84,69	118,00
11-1	0,00	0,00	0,00	14,72
11-2	27,70	27,70	20,08	34,80
11-3	12,90	40,60	15,51	50,31
11-4	19,10	59,80	19,83	70,14
11-5	24,30	84,10	27,43	97,57
11-6	15,80	99,90	19,42	116,99
BTA 11	99,90	99,90	102,26	130,00
12-1	0,00	0,00	0,00	3,06
12-2	27,00	27,00	11,30	14,36
12-3	61,50	88,50	31,94	46,30
12-4	66,30	154,80	18,57	64,88
12-5	18,50	173,30	23,37	88,25
12-6	24,80	198,20	21,09	109,34
BTA 12	198,20	198,20	106,28	109,00

*Dados retirados do site <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html> em 12/01/2007

Foram estabelecidas, para cada par de *primer*, as condições ótimas de amplificação, incluindo concentração de MgCl₂ e temperatura de anelamento. Na Tabela 4 são apresentados estes valores em comparação com os valores de temperatura de anelamento sugeridas pelo MARC/USDA. Os *primers* 12-4 e 12-6 não funcionaram em nenhuma condição testada, portanto foram sintetizados novos *primers* (12-4B e 12-6B) para substituí-los.

Tabela 4: Temperatura de anelamento de cada primer, sugerido pelo MARC e encontrada na Embrapa e concentração de MgCl₂ utilizada nas reações para cada marcador.

Marcador	Temperatura MARC (°C)*	Temperatura Embrapa (°C)	Concentração MgCl ₂ (mM)
10-1	58	54	2,0
10-2	58	56	1,5
10-3	58	52	2,0
10-4	58	52	1,5
10-5	58	54	1,5
11-1	56	54	2,0
11-2	56	52	2,0
11-3	58	54	2,0
11-4	58	56	2,0
11-5	58	52	1,5
11-6	58	54	2,0
12-1	55	54	2,0
12-2	58	54	2,0
12-3	-	50	3,0
12-4b	60	50	3,0
12-5	55	54	2,0
12-6b	55	56	1,5

*Dados retirados do site <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html> em 12/01/2007

Os 17 marcadores foram distribuídos em seis grupos multiplex para eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare), mostrados na Tabela 5. Para a formação destes grupos, procurou-se utilizar *primers* com diferentes fluorocromos na posição 5' e com diferentes tamanhos de fragmentos gerados, evitando, assim, a sobreposição de fragmentos, o que dificultaria a identificação dos alelos. Estes grupos foram formados visando aumentar a velocidade das análises e otimizar os gastos com reagentes e diminuir o tempo.

Tabela 5: Esquema de multiplex para eletroforese.

Marcador	Multiplex
10-4	1
11-3	
10-1	2
10-2	
10-3	
11-4	
10-5	3
11-6	
12-1	
12-5	4
11-1	
11-2	
11-5	
12-2	5
12-3	
12-4b	6
12-6b	

Primeiramente foram analisados os genótipos da população parental, onde foram identificados os alelos que poderiam estar presentes nas demais populações (F1 e F2). Os demais alelos, não identificados na população parental, foram retirados do *bin set* para facilitar o *scoring*, das populações F1 e F2 (Figura 5). Posteriormente às análises dos genótipos dos parentais, seguiram as análises das populações F1 e F2. Os resultados gerados por estas análises foram utilizados, primeiramente para o cálculo da heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Tabela 6). Todos os marcadores apresentaram alto PIC (acima de 0,5) e apenas o 11-6 não apresentou heterozigosidade alta (acima de 0,7), porém, mostrou-se muito próximo do ideal. Com isto, todos os marcadores podem ser considerados como altamente informativos, de acordo com Botstein (1980).

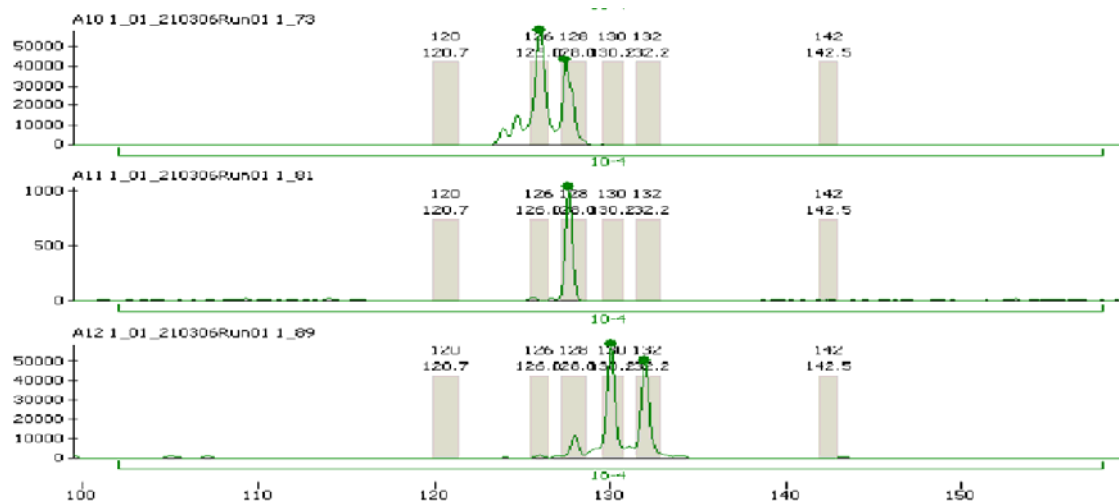


Figura 5: Padrão eletroforético obtido com o *primer* 10-4. Representação gráfica obtida com o programa *Fragment Profiler* onde os dados foram analisados. O animal superior é heterozigoto (126, 128 pb); o intermediário é homozigoto (128, 128 pb) e o inferior é heterozigoto (130, 132 pb). Os alelos 112, 114, 116, 118, 122, 124, 134, 136, 138 e 140 pb foram eliminados do *bin set* que foi utilizado para analisar a população F1 e F2.

Tabela 6: Heterozigosidade observada e esperada e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador.

<i>Locus</i>	H(O)	H(E)	PIC
10-1	0.86	0.80	0.78
10-2	0.90	0.85	0.83
10-3	0.79	0.79	0.76
10-4	0.70	0.69	0.63
10-5	0.85	0.80	0.77
11-1	0.86	0.84	0.82
11-2	0.79	0.77	0.74
11-3	0.78	0.74	0.71
11-4	0.84	0.83	0.81
11-5	0.87	0.77	0.74
11-6	0.68	0.67	0.61
12-1	0.72	0.75	0.71
12-2	0.89	0.83	0.81
12-3	0.91	0.87	0.85
12-4	0.72	0.65	0.58
12-5	0.75	0.69	0.64
12-6	0.72	0.65	0.59

A análise dos 17 marcadores para os três cromossomos resultou em um total de 136 alelos, uma média de 8 alelos por marcador (Tabela 7). Na maioria dos marcadores, o número de alelos encontrados na população de animais F2 da Embrapa Gado de Leite foi menor que o número de alelos reportados no mapa do MARC/USDA. Isto ocorreu, muito provavelmente, devido ao fato de que a população de animais F2 da Embrapa Gado de Leite utilizou apenas duas raças, Gir e Holandês, e um menor número de animais fundadores, enquanto o mapa do MARC é um mapa de referência e utiliza várias raças taurinas e duas Zebuínas (Bishop et al. 1994), aumentando muito a diversidade alélica encontrada.

Tabela 7: Marcação de cada par de *primer*, tamanhos mínimos e máximos esperados e encontrados, em pares de bases (pb) e número de alelos esperados e encontrados.

Par de Primer	Marcação 5'	MARC*			Embrapa		
		Mínimo (pb)	Máximo (pb)	Nº. de alelos	Mínimo (pb)	Máximo (pb)	Nº. de alelos
10-1	FAM	187	223	9	186	224	10
10-2	FAM	79	111	11	77	109	8
10-3	TAMRA	93	111	7	99	119	7
10-4	HEX	112	148	16	120	142	6
10-5	TAMRA	96	116	10	102	122	8
11-1	FAM	243	262	9	240	264	9
11-2	FAM	73	97	9	76	98	6
11-3	TAMRA	208	244	17	209	233	10
11-4	HEX	143	169	14	143	165	10
11-5	TAMRA	102	130	13	103	127	8
11-6	FAM	131	157	7	132	158	6
12-1	HEX	122	152	7	126	160	10
12-2	FAM	148	172	12	151	169	8
12-3	FAM	111	137	9	104	140	14
12-4b	FAM	199	205	4	200	210	6
12-5	FAM	229	241	6	234	244	6
12-6b	HEX	197	217	8	204	220	4
				Total	168	Total	136

*Dados retirados do site <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html> em 12/01/2007

Os tamanhos dos alelos também variaram conforme os dados do MARC. Alguns alelos presentes na população do MARC estavam ausentes na população F2 e também existem novos alelos encontrados na população

F2, ausentes no MARC. No marcador 10-1, foi encontrado um novo alelo, o 186, já para o 10-3, três novos alelos foram encontrados: 113, 117 e 119. O mesmo número de novos alelos foi encontrado no marcador 10-5: 118, 120 e 122. Já no 11-1, os novos alelos foram 240 e 264. No marcador 12-1, foram encontrados também três novos alelos: 154, 156 e 160. No 12-3 foram 104, 138 e 140, no 12-4, o 208 e o 210 e no 12-5 apenas o 244. No total, 18 novos alelos foram encontrados. A maioria destes alelos veio dos parentais de raça Gir e provavelmente, por isso, não estavam presentes nos dados do MARC, que não incluíram esta raça em suas análises.

Na Tabela 8 são apresentadas as percentagens de falhas de genotipagem nas gerações Parental, F1 e F2, para cada marcador. Nela, pode-se observar que os *primers* 12-3 e 12-6 foram os que apresentaram o maior número de falhas devido a dificuldades de amplificação destes *loci*, mesmo após várias tentativas de melhora, com modificações das condições de PCR.

Tabela 8: Percentagem de falhas na genotipagem nos parentais (P), F1 e F2.

Código de trabalho	% de falhas		
	P	F1	F2
10-1	0	0	4
10-2	4	5	4
10-3	0	2	11
10-4	4	3	3
10-5	4	9	6
11-1	0	5	11
11-2	4	11	9
11-3	4	3	6
11-4	4	5	4
11-5	4	9	8
11-6	13	10	10
12-1	0	2	9
12-2	0	7	6
12-3	17	5	12
12-4	4	9	10
12-5	4	2	4
12-6	17	7	11

O resultado das análises de associação realizadas pelo programa QTLEXPRESS, mostrou a existência de QTL ($p < 0,01$) para a característica CompPêlo localizado a 72 cM do cromossomo 10, com os dados coletados no verão (Tabela 9 e Figura 6). No cromossomo 11 foi encontrado um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para TxSud localizado a 0 cM, com os dados coletados no inverno (Tabela 10 e Figura 7). No cromossomo 12 foi encontrado também um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para a característica CompPêlo localizado a 28 cM, porém, com os dados coletados no inverno (Tabela 11 e Figura 8).

De acordo com metodologia do programa, o efeito aditivo é dado por: $P(QQ) - P(qq)$ e, sabendo-se que, neste caso, $P(QQ)$ é a probabilidade de se ter alelos provenientes dos animais de raça Holandesa, e $P(qq)$ é a probabilidade de se ter alelos provenientes dos animais de raça Gir, um valor positivo, como os que foram encontrados para todos os QTL, significa que os animais de raça Holandesa sofrem maior variação nas características para as quais foram encontradas associações significantes, do que os Gir.

Para a característica comprimento de pêlo, isto significa que os animais de raça Holandesa contribuem mais para o aumento do tamanho dos pêlos do que os de raça Gir. Esta contribuição ocorre de maneira diferenciada no verão e no inverno, já que os QTL para estas duas situações estão nos cromossomos 10 e 12 respectivamente. Já para a característica taxa de sudação, os animais da raça Holandesa também mostraram suar mais que os da raça Gir, quando expostos a condição de estresse calórico. Porém, para esta última característica, somente foi encontrada associação estatística significativa dos marcadores com os dados coletados no inverno.

O efeito dos QTL (em porcentagem) foi calculado da seguinte maneira: $(\text{efeito aditivo})^2 / (\text{soma do quadrado residual do modelo reduzido}) \times 100$. Este efeito significa qual o percentual da variação fenotípica que este QTL está explicando. O efeito do QTL para CompPêlo no verão, no cromossomo 10, foi 7,82%, enquanto que CompPêlo no inverno, no cromossomo 12 foi 10,21%. Já o efeito do QTL para TxSud no inverno, no cromossomo 11, foi 9,27%.

Tabela 9: Estatística F, localização em cM, efeitos aditivo e de dominância, média da característica e efeito do QTL para as análises no inverno e verão no cromossomo 10, utilizando o mapa gerado pelo Programa CRIMAP.

Característica	F	Localização (cM)	Efeito aditivo	Efeito de dominância	Efeito do QTL (%)
DifTR Inverno	0,82	34	-0,09	-0,003	0,01
DifTR Verão	2,46	21	0,16	-0,30	0,05
DifMR Inverno	2,13	1	6,48	-4,94	0,02
DifMR Verão	3,63	18	4,22	-12,24	0,04
DifTPele Inverno	1,48	57	0,64	1,76	0,01
DifTPele Verão	4,62	39	1,92	0,74	0,16
TxSud Inverno	2,69	63	-28,60	-39,83	0,04
TxSud Verão	3,15	43	-27,90	-77,44	0,04
CompPêlo Inv	2,40	0	0,06	-0,08	0,02
CompPêlo Ver	7,07**	72	0,05	0,13	0,06
EspessCapa Inv	1,05	45	-0,06	0,29	0,00
EspessCapa Ver	1,75	15	0,08	0,46	0,00
CompCapa Inv	1,99	0	0,05	-0,06	0,02
CompCapa Verão	1,27	6	0,05	-0,02	0,05
DensidPêlo Inv	1,85	34	-10,77	-1,07	0,03
DensidPêlo Verão	2,43	72	4,61	17,53	0,01

** p<0,01

DifTR = diferença entre a temperatura retal antes e depois da submissão ao estresse, DifMR = diferença entre a taxa de movimentos respiratória antes e depois da submissão ao estresse, DifTPele = diferença entre a temperatura da pele antes e depois da submissão ao estresse, TxSud = taxa de sudação, CompPêlo = comprimento do pêlo, DensidPêlo = densidade dos pêlos, EspessCapa = espessura da capa e CompCapa = comprimento da capa.

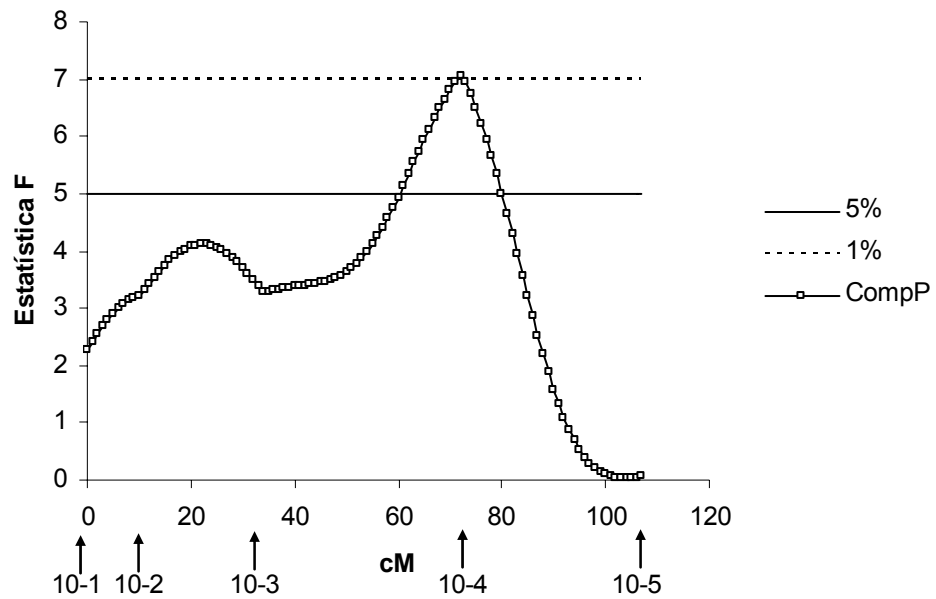


Figura 6: Localização do QTL para comprimento de pêlo no verão, localizado a 72 cM no cromossomo 10 e o valor do F calculado. As setas indicam a posição dos marcadores.

Na região onde foram encontrados os QTL sugestivos não foram encontrados genes descritos influenciando quaisquer características que poderiam estar ligadas à resistência do animal ao estresse calórico. No cromossomo 10, as regiões próximas ao QTL detectado contêm QTL descritos na literatura apenas ligados à reprodução e produção de leite. No início do cromossomo 11 não existem QTL descritos. E na região do QTL encontrado no cromossomo 12, existem apenas QTL descritos para produção de leite. Isto ressalta a importância de um futuro mapeamento fino da região onde foram encontrados os QTL sugestivos para a detecção de um possíveis genes que possam existir nos locais e sua utilização nos programas de melhoramento genético dos bovinos para a resistência ao estresse calórico.

Tabela 10: Estatística F, localização em cM, efeitos aditivo e de dominância, média da característica e efeito do QTL para as análises no inverno e verão no cromossomo 11, utilizando o mapa gerado pelo Programa CRIMAP.

Característica	F	Localização (cM)	Efeito aditivo	Efeito de dominância	Efeito do QTL (%)
DifTR Inverno	1,49	27	-0,01	0,18	0,00
DifTR Verão	1,47	67	-0,09	-0,27	0,01
DifMR Inverno	2,38	21	0,59	13,25	0,00
DifMR Verão	2,71	27	6,72	2,88	0,10
DifTPele Inverno	4,64	91	-0,80	2,07	0,02
DifTPele Verão	3,40	43	-1,59	0,92	0,11
TxSud Inverno	5,61*	0	32,41	28,17	0,05
TxSud Verão	3,30	96	48,10	0,80	0,12
CompPêlo Inverno	1,23	40	-0,05	0,04	0,01
CompPêlo Verão	2,10	88	0,01	-0,08	0,00
EspessCapa Inverno	3,94	27	0,32	-0,06	0,07
EspessCapa Verão	3,42	59	1,00	0,59	0,64
CompCapa Inverno	3,62	90	-0,05	0,11	0,02
CompCapa Verão	2,36	28	-0,07	0,01	0,09
DensidPêlo Inverno	2,27	3	12,07	-6,07	0,03
DensidPêlo Verão	2,04	41	-3,29	-13,95	0,01

* $p < 0,05$

DifTR = diferença entre a temperatura retal antes e depois da submissão ao estresse, DifMR = diferença entre a taxa de movimentos respiratória antes e depois da submissão ao estresse, DifTPele = diferença entre a temperatura da pele antes e depois da submissão ao estresse, TxSud = taxa de sudação, CompPêlo = comprimento do pêlo, DensidPêlo = densidade dos pêlos, EspessCapa = espessura da capa e CompCapa = comprimento da capa.

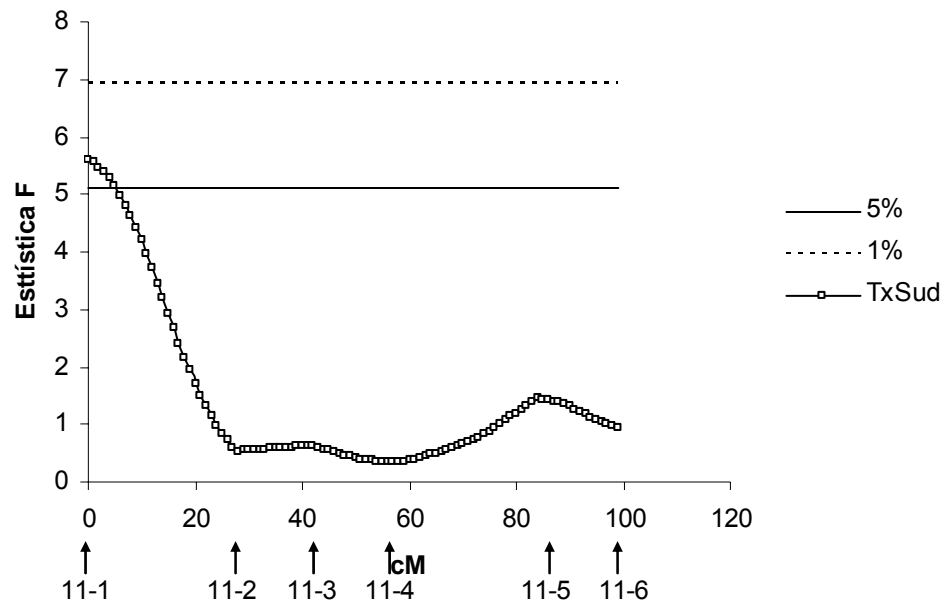


Figura 7: Localização do QTL para taxa de sudação no inverno, localizado a 0 cM no cromossomo 11 e o valor do F calculado. As setas indicam a posição dos marcadores.

Tabela 11: Estatística F, localização em cM, efeitos aditivo e de dominância, média da característica e efeito do QTL para as análises no inverno e verão no cromossomo 12, utilizando o mapa gerado pelo Programa CRIMAP.

Característica	F	Localização (cM)	Efeito aditivo	Efeito de dominância	Efeito do QTL (%)
DifTR Inverno	1,37	16	-0,03	-0,21	0,00
DifTR Verão	4,83	120	0,48	-0,61	0,44
DifMR Inverno	1,32	50	-7,46	10,13	0,04
DifMR Verão	2,24	154	-5,41	4,53	0,06
DifTPele Inverno	4,57	198	-1,23	-1,71	0,05
DifTPele Verão	3,54	180	0,46	-2,71	0,01
TxSud Inverno	1,08	69	-22,19	-29,35	0,02
TxSud Verão	2,10	66	44,27	-140,25	0,10
CompPêlo Inverno	6,21*	28	0,10	0,11	0,06
CompPêlo Verão	2,79	115	-0,01	0,27	0,01
EspessCapa Inverno	1,62	89	-0,19	-0,15	0,02
EspessCapa Verão	1,92	112	-0,58	0,20	0,22
CompCapa Inverno	2,66	198	-0,07	-0,08	0,03
CompCapa Verão	4,08	163	-0,02	0,15	0,01
DensidPêlo Inverno	5,09	0	1,19	25,79	0,00
DensidPêlo Verão	5,13	0	-3,15	23,22	0,01

* $p < 0,05$

DifTR = diferença entre a temperatura retal antes e depois da submissão ao estresse, DifMR = diferença entre a taxa de movimentos respiratória antes e depois da submissão ao estresse, DifTPele = diferença entre a temperatura da pele antes e depois da submissão ao estresse, TxSud = taxa de sudação, CompPêlo = comprimento do pêlo, DensidPêlo = densidade dos pêlos, EspessCapa = espessura da capa e CompCapa = comprimento da capa.

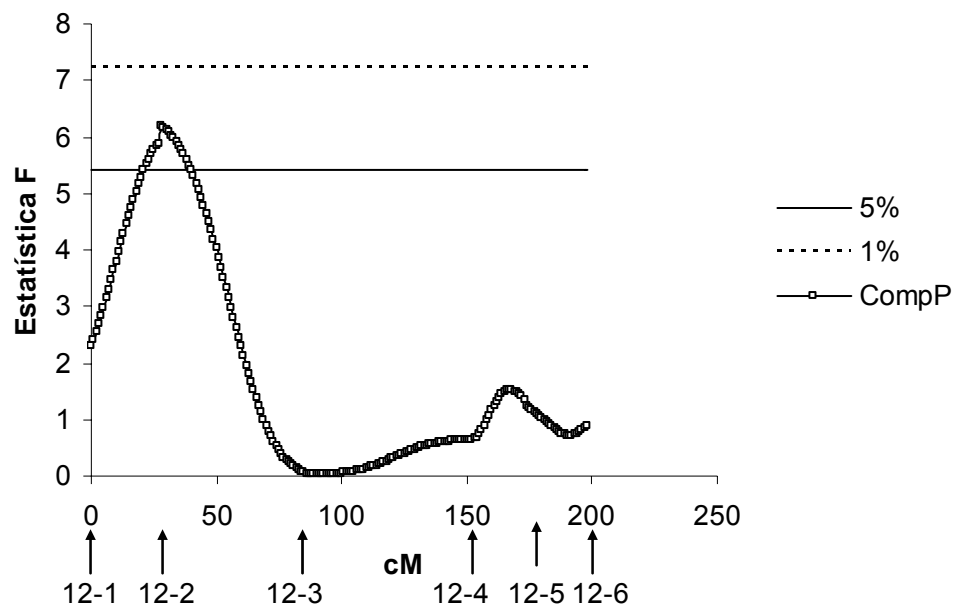


Figura 8: Localização do QTL para comprimento de pêlo no inverno, localizado a 28 cM no cromossomo 12 e o valor do F calculado. As setas indicam a posição dos marcadores.

5. Conclusões

A estratégia da varredura genômica com marcadores microssatélites utilizando as diferenças genéticas relativas à resistência ao estresse calórico, entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus*, se mostrou adequada para a detecção de QTL, já que foi possível detectar dois QTL sugestivos ($p < 0,05$) para as características “comprimento de pêlo no inverno” e “taxa de sudação no inverno” nos cromossomos 11 e 12, respectivamente, e um QTL ($p < 0,01$) para a característica “comprimento de pêlo no verão”.

O mapeamento fino dessas regiões será necessário para o entendimento do efeito de cada QTL e a detecção de genes candidatos que poderão estar presentes nestas regiões.

6. Referências Bibliográficas

Beckmann, J. S.; Soller, M. Detection of linkage between marker loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. **Theor. Appl. Genet.** 76, 228–236, 1988.

Bishop, M.D.; Kappes, S.M.; Keele, J.W.; et al. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, 136, 619-625, 1994.

Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet**, 32, 314-331, 1980.

Lefcourt, A. M.; Bitman, J.; Kahl, S. et al. Circadian and Ultradian Rhythms of Peripheral Cortisol Concentrations in Lactating Dairy Cows. **J Dairy Sci** 76:2607-2612, 1993.

Campos, A. T., Pires, M. F. A., Júnior, J. L. C. S. Costa, L. C. 2004. Zoneamento da pecuária leiteira da Região Sudeste. <http://www.cnpqi.embrapa.br/zoneamento/sudeste/sudeste.html> Consultado em 07/08/2006.

Carvalho, F.A.; Lammoglia, M.A.; Simões, M.J. et al. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, v.73, n.12, p.3570-3573, 1995.

Cunningham, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 545p. 1999.

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

Guimarães, C.M.C.; Falco, J.E.; Titto, V.A.L. et al. Termorregulação em Bubalinos submetidos a duas temperaturas do ar e duas proporções de volumoso:concentrado. **Ciências Agrotécnicas**, v.25, n.4, p.991-998, 2001.

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

- Haley, C.S., Knott, S.A., Elsen, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.36, p.1195-1207. 1994.
- Hansen, P.J., Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to termal stress. *Animal Reproduction Science*, V. 82-83, p. 349-360. 2004.
- Ihara, N.; Takasuga, A.; Kazunori Mizoshita, et al. A Comprehensive Genetic Map of the Cattle. **Genome Research** 14, 1987-1998, 2004.
- Kadzere, C.T., Murphy, M.R., Silanikove, N., Maltz, E. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**. 77 (2002) 59-91.
- Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T. et al. A second-generation map of the bovine genome. **Genome Research** 7, 235-241, 1997.
- Lander, E. S.; Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121, 185–199, 1989.
- Lee, D.H.K. Manual of field studies on heat tolerance of domestics animals. Roma: FAO, 1953. 166p.
- Liu, B.H. **Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis**. 1998. 611p. www.google.com.br/books. Acessado em 13/02/2007.
- Machado, M. A.; Martinez, M. L., Acelerando o melhoramento com o mapeamento do genoma bovino. **Informe Agropecuário**. 22, 98-104, 2001.
- Martinez, M.L.; Machado, M.A.; Ferreira, A.M. Biotecnologia na pecuária: genética molecular. **Informe Agropecuário** 21, 67-78, 2000.
- McDowell, R.E. Determining the suitable of livestock to warm climates. In: **Improvement of livestock production in warm climates**. W.H. Freeman and Co., São Francisco, 432 p., 1972.
- Meuwissen, T. H. E., Goddard, M. E. **Genetic Selection Evolution**, v.28, p.161. 1996.
- Fairfull, R.W., Muir, W.M. 1999. Quantitative genetics *versus* molecular genetics in poultry breeding. In. **Anais Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Palestra 4 1997
- Olson, T. A., Lucena, C., Chase, C. C., et al. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. *American Society of Animal Science*. **J. Anim. Sci.** 2003. 81: 80–90.
- Paula-Lopes, F. F., Chase, C. C., Al-Katanani, Y. M., et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of pre-implantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to

increased culture temperatures. **Society for Reproduction and Fertility** 1470-1626/2003.

Paterson, A.H. QTL mapping in DNA marker-assisted plant and animal improvement. In: PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. CRC Press, New York, 1998a, p.131-143.

Paterson, A.H. Of blending, beans, and bristles: the foundations of QTL mapping. In: PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. CRC Press, New York, 1998b, p.1-10.

Pires, M.F.A., Ferreira, A.M., Coelho, S.G. Estresse calórico em bovinos de leite. **Anais do I Simpósio de Produção e Nutrição de Gado de Leite**, Belo Horizonte, p.17-30, 1998.

Pires, M.F.A., Saturnino, H.M., Verneque, R.S. et al. Efeito das estações (inverno e verão) na temperatura retal e frequência respiratória d vacas Holandesas confinadas em free stall. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.6, p.747-752, 1998.

Pires, M.F.A., Ferreira, A.M., Saturnino, H.M. et al. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall no inverno e verão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.1, p.57-63, 2002.

Plastow, G.S. 2000. Molecular genetics in the swine industry. Anais do Simpósio Nacional de Melhoramento Animal 3, Belo Horizonte, MG: **SBMA**, 2000, p.21-30.

Regitano, L.C.A. Importância da genética molecular para o melhoramento de ruminantes. (compact disc). Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5., Pirassununga, 2004. Anais. Pirassununga: **SBMA**, 2004.

Schleger, A.V. E Turner, H.G. Sweating rates of cattle in field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Australian Journal Agriculture Research**, v.24, p.1291-1300, 1965.

Seaton, G., Haley, C.S., Knott, S.A. et al. 2002. QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v.18, n.2, p.339-340. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>. Acessado em 21 e 22 de janeiro de 2003.

Silva, R.G., **Introdução à Bioclimatologia Animal** – São Paulo: Nobel, 2000.

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

Sonstegard, T.S.; Tassell, C.P.V. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genet. Res.**, Camb. 84, 3–9, 2004.

Srikandakumar, A. and Jonhson, E.H. 2004. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milking zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, 36 (2004) 685-692.

Swenson, M.J.; Reece, W.O (Ed.). Dukes – **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996. 856p.

Van Tassel, C.; Sonstergard, T. S.; Ashwell. M.S. Application of genomics to dairy cattle breeding. **Anais do VI Congresso Holstein de Las Americas** 155-167, 2001.

Weller, J.I. **Quantitative Trait Loci Analysis in Animals**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2001, 287p. www.google.com.br/books. Acessado em 13/02/2007.

William, D.B. QTL analysis: power, precision and accuracy. In: PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. CRC Press, New York, 1998, p. 145-162.

www.cna.org.br consultado em 26 de março de 2007.

www.agricultura.gov.br consultado em 26 de março de 2007.