

Identificação de QTL nos cromossomos 10, 11 e 12 associados ao estresse calórico em bovinos

Mapping Heat Stress QTL on Bovine Chromosomes 10, 11 and 12

Pires, MFA^{*1}; Columbiano, VS²; Azevedo, ALS³; Belo VA⁴; Verneque, RS¹; Teodoro, RL¹; Peixoto, MGCD¹ e Machado, MA¹

1- Pesquisadores - Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora, MG – Brasil – fatinha@cnpqg.embrapa.br

2- Mestre em Zootecnia - Universidade Federal de Viçosa/ Viçosa, MG - Brasil

3- Doutoranda em Genética e Melhoramento - Universidade Federal de Viçosa/ Viçosa, MG - Brasil

4- Mestranda em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora/ Juiz de Fora, MG – Brasil

Resumo

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 à esta resistência como um auxílio nos programas de melhoramento, visando à obtenção de animais termotolerantes e, conseqüentemente, mais produtivos. O desenvolvimento deste trabalho buscou mapear regiões genômicas relacionadas à resistência ao estresse calórico em uma população F2 de bovinos (Holandês x Gir) nos cromossomos 10, 11 e 12. 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 frequência de movimentos respiratórios antes e depois da exposição ao estresse calórico (DifMR), taxa de sudorese após a exposição ao estresse calórico (TxSud), densidade da capa (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 distribuídos nos três cromossomos citados foi avaliado. 480 animais foram genotipados, sendo 31 parentais, 73 F1 e 376 F2. 315 F2 foram considerados nas análises fenotípicas. 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. 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, já que foram detectados três QTL.

Palavras – Chave: biotecnologia, gado leiteiro, marcador molecular.

Abstract

Heat stress, especially in tropical regions, consists an important source of economic loss in the cattle breeding, with adverse effect on the milk production, meat production, production physiology, reproduction, mortality of calves and udder health. These effect can be brightened up using it existing genetic variation between *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds for the molecular characteristics associates with resistance to the heat and markers associates with this resistance, helping the breeding programs, aiming at to the attainment of heat-tolerant animals and, consequentially, more productive. The development of this work searched to map genomics sequences related with heat stress resistance in a F2 population of bovinos (Holstein x Gyr) in chromosomes 10, 11 and 12. The evaluated characteristics had been: difference between the rectum temperature before and after the exposition to the heat stress (DifTR), difference between the skin temperature before and after the exposition to the heat stress (DifTPele), difference between the respiratory movements frequency before and after the exposition to the heat stress (DifMR), sweat tax after the exposition to the heat stress (TxSud), density of the skin (Dens), coat size (CompPêlo), length of layer (CompCapa) and thickness of layer (EspessCapa). All the measures had been taken in the summer and in the winter and the data had been analyzed in such a way. A total of 17 *loci* microsatellites distributed in the three cited chromosomes was evaluated. 480 animals had been genotyped, being

31 parental, 73 F1 and 376 F2. 315 F2 had been considered in the phenotype analyses. The result of the analyses carried through by the QTLEXPRESS software, showed QTL ($p < 0,01$) for CompPêlo characteristic located at 72 cM in chromosome 10, with the data collected in the summer. In chromosome 11 a suggestive QTL ($p < 0,05$) for TxSud, located at 0 cM, was found with the data collected in the winter. In chromosome 12 a suggestive QTL ($p < 0,05$) for CompPêlo characteristic located at 28 cM, was also found, however, with the data collected in the winter. The strategy of the genomic sweepings with microsatellites marking showed adequate for the QTL identification, since two suggestive QTL had been detected.

Keywords: Biotechnology, dairy cattle, molecular markers.

Introdução

Uma fonte importante de perda econômica na atividade leiteira em todo 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*) puras ou cruzadas que são amplamente utilizadas devido ao seu potencial de adaptação às condições adversas dos trópicos e, à falta de adaptação das raças especializadas (*Bos taurus*) a estes climas (Machado e Martinez, 2001). 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 (Hansen, 2004). A temperatura retal é freqüentemente usada como índice de adaptabilidade fisiológica aos ambientes quentes, pois seu aumento mostra que os mecanismos de dissipação de calor tomaram-se insuficientes para manter a homeotermia (Silva, 2000). O aumento da freqüência respiratória e da ofegação são mecanismos fisiológicos importantes para a dissipação de calor, assim como a liberação de calor pela evaporação da água por meio da sudorese. Esta última é também considerada um indicador de "adaptabilidade" (Carvalho et al., 1995). 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. 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).

Material e Métodos

O trabalho experimental foi realizado no Campo Experimental Santa Mônica (CESM), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Valença, Estado do Rio de Janeiro. Foram utilizados 315 animais F2 (Holandês x Gir) 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. Na tarde anterior ao dia da avaliação, os animais foram alocados em uma câmara climática, com capacidade para 5 animais, em condições de termo-neutralidade (temperatura de 22°C e 70% de umidade relativa), onde permaneceram por um período de 12 horas. Na manhã seguinte (6:00), foram obtidas a temperatura retal, temperatura da pele, freqüência respiratória e duas amostras (10ml) de sangue. As 8:00hs foi acionado o mecanismo para aumentar a temperatura ambiente até atingir 42°C. Após um período de 6 hs (17:00hs), nesta temperatura, foram coletados os mesmos dados citados anteriormente, além da taxa de sudação. A temperatura retal foi obtida com um termômetro clínico digital inserido, aproximadamente, 7,5 cm no reto; a freqüência respiratória por movimentos do flanco durante 30 segundos e a taxa de sudação pelo método de cloreto de cobalto desenvolvido por Berman (1957) e modificado por Schleger & Turner (1965). Na tarde anterior ao dia da coleta, os animais foram classificados de acordo com a coloração e o tipo de pelo e pigmentação da epiderme. Foi atribuído um escore de 1 a 4 de acordo com a maior ou menor intensidade de pelagem clara (1=totamente clara - vermelho ou amarelo claro); 2= > 50% de pelagem clara; 3= >50% de pelagem escura (preto ou vermelho escuro); 4= totalmente escura. Os pêlos foram classificados em lisos (1) ou lanados (2). Foi mensurada também a espessura da capa externa, com o auxílio do paquímetro de precisão, em três locais diferentes do corpo dos animais. Após essa mensuração, foram obtidas amostras do pêlo com o auxílio de um alicate, segundo o método divulgado por Lee (1953). Essas amostras, obtidas nos mesmos locais onde mediu-se a espessura da capa, foram armazenadas em envelopes de plástico, para

posterior contagem e mensuração do comprimento e densidade numérica dos pêlos. As características avaliadas foram: diferença entre a temperatura retal antes e depois da submissão ao estresse (DiTR); diferença entre a temperatura da pele antes e depois da submissão ao estresse (DiTPele); 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). Foi extraído o DNA genômico de todos os animais: progenitores das raças Gir e Holandesa, progenitores F1 e animais F2. Para a genotipagem dos cromossomos 10, 11 e 12 foram selecionados 17 marcadores microssatélites espaçados em intervalos de 20 cM. Os produtos das ampliações foram detectados por eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os genótipos foram analisados no programa Fragment Profiler (GE Healthcare). 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. 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);

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

Onde,

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

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

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

E_{ijkl} = erro;

l = animal.

Resultados e Discussão

O resultado das análises de associação apresentadas na Tabela 1 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, no cromossomo 11 foi encontrado um QTL sugestivo ($p < 0,05$) para TxSud localizado a 0 cM, com os dados coletados no inverno e 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. Estes dados evidenciam a importância da morfologia dos pelos e pelagem na resistência ao estresse calórico, o que também foi constatado por Olson et al. (2003).

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.

Tabela 1. 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, 11 e 12 utilizando o mapa gerado pelo Programa CRIMAP.

Característica	F	Cromossomo	Localização (cM)	Efeito aditivo	Efeito de dominância	Efeito do QTL (%)
CompPêlo Verão	7,07**	10	72	0,05	0,13	0,06
TxSud Inverno	5,61*	11	0	32,41	28,17	0,05
CompPêlo Inverno	6,21*	12	28	0,10	0,11	0,06

** p<0,01

* p<0,05

TxSud = taxa de sudação, CompPêlo = comprimento do pêlo

Conclusões

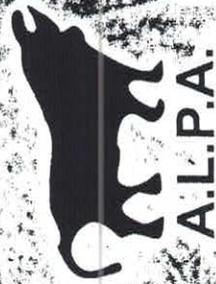
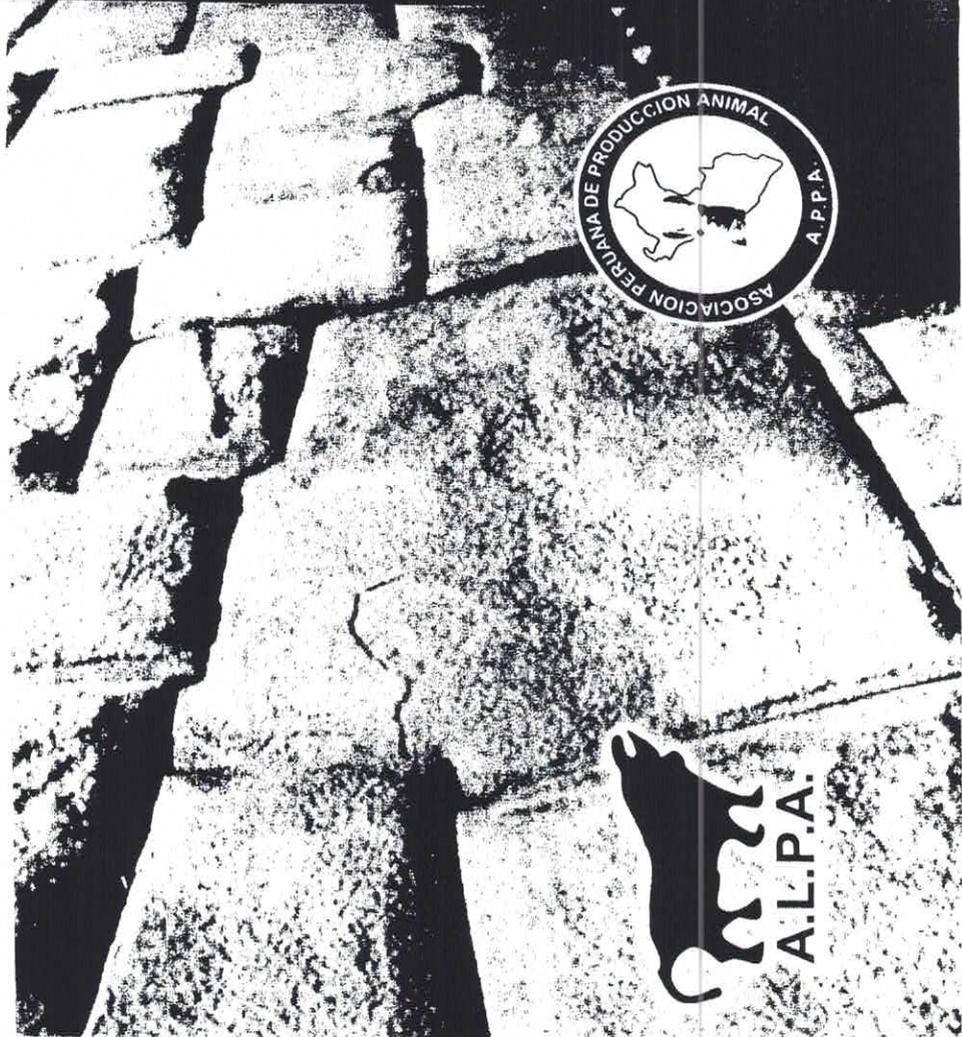
A estratégia da varredura com marcadores microssatélites utilizando as diferenças genéticas relativas à resistência ao estresse calórico, entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus*, mostrou-se adequada para a detecção de QTL. É necessário um mapeamento fino das regiões onde foram encontrados os possíveis QTL para o entendimento do efeito de cada QTL e a detecção de genes candidatos que poderão estar presentes nestas regiões e futuramente serem utilizados em programas de melhoramento animal, especialmente na seleção assistida por marcadores.

Referências Bibliográficas

- Berman, A. Influence of some factors on the relative evaporation rate from the skin of cattle. 1957. *Nature* 179: 1256.
- Carvalho, F.A., M.A. Lammoglia, M.J. Simões, et al. 1995. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. *J. Anim. Sci.* 73: 3570-3573.
- Hansen, P.J. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to heat stress. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 349-360.
- Lee, D.H.K. 1953. *Manual of field studies on heat tolerance of domestic animals*. Roma: FAO. 166 p.
- Machado, M.A. y M.L. Martínez. 2001. Acelerando o melhoramento com o mapeamento do genoma bovino. *Informe Agropecuário*. 22: 98-104.
- Olson, T.A., C. Lucena, C.C. Chase, et al. 2003. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 80-90.
- Schleger, A., H.G. Turner. 1965. Sweating rates of cattle in field and their reaction to diurnal and seasonal changes. *Australian Journal Agriculture Research* 16: 92-106.
- Seaton, G., C.S. Haley, S.A. Knott, et al. 2002. QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics*. 18: 339-340. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>. Acessado em 21 e 22 de janeiro de 2003.
- Silva, R.G. 2000. *Introdução à Bioclimatologia Animal*. Nobel Editora. São Paulo, Brasil.



V CONGRESO INTERNACIONAL DE GANADERIA DE DOBLE PROPOSITO



XX REUNION ASOCIACION LATINOAMERICANA DE PRODUCCION ANIMAL (ALPA)
XXX REUNION ASOCIACION PERUANA DE PRODUCCION ANIMAL (APP)
V CONGRESO INTERNACIONAL DE GANADERIA DE DOBLE PROPOSITO

Del 21 al 25 Octubre 2007 - Cuzco - Perú
INFORMES: appa.alpa2007@gmail.com inscripciones.alpa2007@gmail.com
www.alpa.org.pe

