

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Associação genômica entre polimorfismos de base única e área olho de lombo avaliada no período *post mortem* em bovinos da raça Nelore¹

Carolyn Aboujaoude², Fernando Baldi³, Rafael Espigolan⁴, Daniel Mansan Gordo⁴, Rafael L. Tonussi⁴, Lucia G. Albuquerque⁵,

¹Trabalho financiado pela FAPESP

²Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – Unesp, Jaboticabal. e-mail: carolynaboujaoude@hotmail.com

³Professor Titular – UNESP, Jaboticabal. Pesquisador.

⁴Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – Unesp, Jaboticabal.

⁵Professora Titular – UNESP, Jaboticabal. Pesquisadora do CNPq e do INCT-CA. e-mail: lgalb@fcav.unesp.br

Resumo: O objetivo deste trabalho foi estudar a associação de polimorfismos de base única no genoma de bovinos da raça Nelore para área de olho de lombo (AOL), avaliada no período *post mortem*. Foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de 726 machos da raça Nelore entre a 12^a e 13^a costelas da meia carcaça esquerda. O DNA foi extraído do tecido muscular com kit DNeasy Blood & Tissue Kit da Qiagen. A genotipagem foi realizada, utilizando o painel BovineHD BeadChip com 777.962 marcadores do tipo SNP, segundo protocolo da Illumina. Aplicando a correção de testes múltiplos de Bonferroni ($p < 1,2 \times 10^{-7}$), não foram constatados SNPs significativos. Os principais picos de SNPs significativos ($p < 0,001$) para AOL foram observados nos cromossomos 2, 6, e 10.

Palavras-chave: carcaça, carne, *Longissimus dorsi*, melhoramento genético, produtividade

Genome wide association between single nucleotide polymorphisms and loin eye area evaluated in post mortem period in Nellore cattle

Abstract: The aim of this study was to investigate the association of single nucleotide polymorphisms in the genome of Nellore cattle with loin eye area (LEA) evaluated during post mortem. 726 *Longissimus dorsi* muscle samples from Nellore males were collected between the 12th and 13th ribs of the left half carcass. The DNA was extracted from the muscle tissue using the DNeasy Blood & Tissue Kit from Qiagen. Genotyping was performed using the BovineHD BeadChip panel with 777,962 SNP markers, according to the Illumina protocol. According to the Bonferroni method ($p < 1.12 \times 10^{-7}$), no significant SNPs were found. The main peaks of significant ($p < 0.001$) SNPs for LEA, were observed on chromosomes 2, 6, and 10.

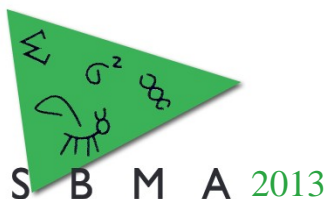
Keywords: carcass, genetic improvement, *Longissimus dorsi*, meat, productivity

Introdução

Existe uma associação entre a área de olho de lombo (AOL), e o rendimento da carcaça em cortes comercializáveis (Figueiredo, 2000), então a AOL pode influenciar o valor comercial da carcaça. Assim, a medida da AOL permite a identificação de animais superiores quanto à musculosidade. O estudo da associação genômica ampla (GWAS) é usado para analisar associação utilizando variações existentes por todo o genoma, principalmente nos polimorfismos de base única (SNPs) junto aos fenótipos e informações de parentescos (Goddard & Hayes, 2009). Estudos de associação genômica ampla, utilizando painéis de alta densidade, ainda não são comuns em animais de raças zebuínas. A utilização das informações genômicas para seleção poderá trazer ganhos genéticos significativos nas características de carcaça, que são de difícil e/ou alto custo de mensuração, além de serem de expressão tardia. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação de polimorfismos de base única no genoma de bovinos da raça Nelore com área olho de lombo avaliada no período *post mortem*.

Material e Métodos

Foram utilizados 726 machos da raça Nelore, nascidos entre 2008 e 2009, filhos de 108 touros e pertencentes a três programas de melhoramento genético (Conexão delta G, Paint, e Qualitas). Foram formados 117 grupos contemporâneos, constituídos por: fazenda, ano de nascimento, grupos de manejo ao nascimento, à desmama e ao sobreano. O abate dos animais ocorreu em plantas frigoríficas comerciais,



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

e as carcaças foram resfriadas por, no mínimo, 24 horas. Após o resfriamento, foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* com osso, de espessura aproximada a 2,54 cm (uma polegada), entre a 12^a e 13^a costela da meia carcaça esquerda de cada animal. As amostras foram embaladas a vácuo e mantidas em câmara de resfriamento até completarem 150 horas pós-abate sob temperatura de 1°C. Após o período de resfriamento, com estabelecimento pleno do *rigor mortis*, as amostras foram congeladas a temperatura de -20°C. As análises físicas da carne foram realizadas no Laboratório de Qualidade e Certificação da Carne - LQCC, sediado na Central Bela Vista - Genética Bovina Ltda no município de Pardinho, estado de São Paulo. A análise da AOL foi realizada pelo método do quadrante de pontos. A média para AOL foi de $64,99 \pm 7,97$ cm², sendo o mínimo de 40 e o máximo 90 cm².

Foram pesados fragmentos de tecido muscular correspondente ao músculo *Logissimus dorsi* variando de 25 a 30 mg, para extração do DNA com kit DNeasy Blood & Tissue Kit da Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). A quantificação e verificação da pureza do DNA extraído foram realizadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000. O grau de pureza foi determinado pela relação de absorbância 260/280 (Held, 2008). Posteriormente, as amostras de DNA foram encaminhadas para genotipagem utilizando o painel BovineHD BeadChip de alta densidade, segundo protocolo da Illumina, com o aparelho HiScan™SQ System. O Bovine HD BeadChip contém 777.962 marcadores do tipo SNP espalhados pelo genoma com uma distância média entre marcadores de 3,43 kb. O software GenomeStudio (Illumina ®) foi utilizado para analisar as imagens do HiScan e obter a consistência dos dados genômicos e os genótipos. Foram considerados todos os 29 autossomos bovinos.

O controle de qualidade dos dados e a preparação dos genótipos foram realizados no prompt de comando de UNIX, presente no sistema operacional Fedora. Os genótipos foram definidos como 0 (AA), 1 (AB) e 2 (BB), e os não identificados como 5. Os critérios de exclusão utilizados para o controle de qualidade foram $MAF < 0,05$, $Heterozigose > 0,30$, $Call Freq < 0,93$, intensidade média do *cluster* $> 0,30$, remoção dos cromossomos sexuais, e remoção de marcadores com baixa frequência A/B. Após o controle de qualidade, restaram 446.986 marcadores disponíveis para a associação genômica.

As análises de associação foram realizadas considerando apenas um marcador por vez, utilizando o comando MACRO e o procedimento MIXED do programa SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., NC, USA). Os efeitos fixos considerados no modelo foram: marcador SNP, grupo de contemporâneos, data de abate (15 níveis) e idade de abate como covariável (efeito linear). A taxa de falsos positivos (FPR) foi calculada pelo método descrito por Benjamini & Hochberg (1995): $FPR = (m \cdot p) / n$; onde m é o número de marcadores testados, p é o nível de significância e n consiste no número de marcadores significativos (nível de significância $< p$) para cada característica. Os níveis de significância considerados para os marcadores foram 5, 1 e 0,1%. O teste de Bonferroni ao nível de 5% também foi aplicado.

Resultados e Discussão

Foram encontrados 26.662 SNPs significativos ao $p < 0,05$, 5.974 ao $p < 0,01$ e 649 ao $p < 0,001$. Aplicando a correção de testes múltiplos de Bonferroni ($p < 1,12 \times 10^{-7}$), não foram constatados SNPs significativos, provavelmente por ser um nível de restrição alto, sendo este um teste conservador.

A taxa de FPR, considerando os SNPs significativos ($p < 0,001$), foi de 68,9%. Os principais picos de SNPs significativos ($p < 0,001$), para AOL foram observados nos cromossomos 2, 6, e 10, enquanto que os de menor número de SNP foram os cromossomos 19 e 26 (Figura 1).

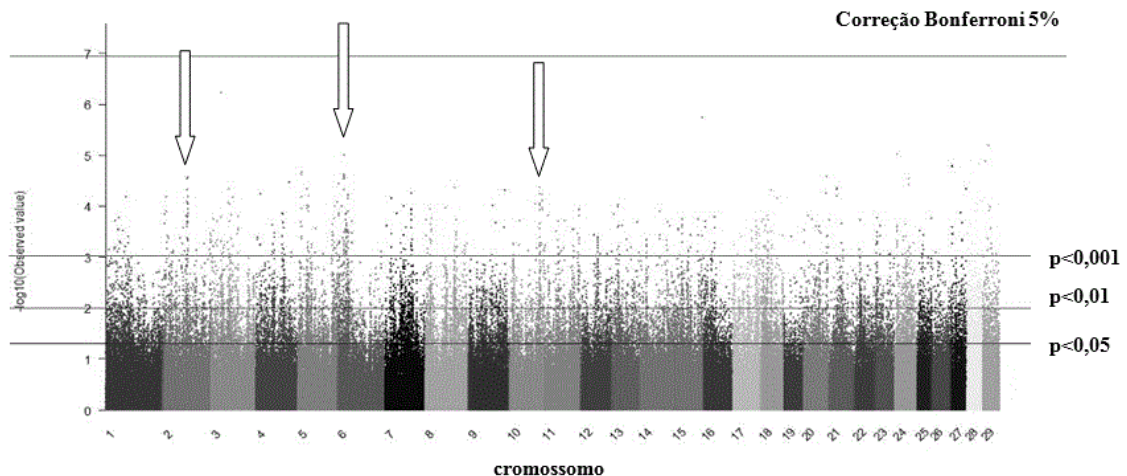


Figura 1 Manhattan plot dos resultados da associação genômica para AOL em bovinos da raça Nelore.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os de Casas (2002), que encontrou locos de características quantitativas associadas a AOL nos cromossomos 2 e 6 nas posições 4 e 49 cM, respectivamente, nos cruzamentos Brahman X Hereford e Piedmontese X Angus. Da mesma forma, Casas et al. (2000) encontram associação desta característica com marcadores no cromossomo 6 entre as posições 4,8 e 51 cM no cruzamento Belgian Blue X MARC III.

Conclusões

Foram identificados SNPs afetando significativamente a área olho de lombo nos cromossomos 2, 6 e 10 na raça Nelore. Isso pode facilitar a seleção de animais superiores quanto à musculosidade.

Literatura citada

- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. [1995]. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v.57, n.1, 1995. Available at: <<http://www.jstor.org/stable/2346101>> Accessed on: Jun. 19, 2013.
- CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W. et al. [2000]. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**. Available at: <<http://www.journalofanimalscience.org/content/78/3/560.full.pdf>> Accessed on: Jun. 19, 2013.
- CASAS, E. [2002]. Identification of quantitative trait loci in beef cattle. **Archivos Latinoamericanos De Produccion Animal**. v.10, n.1, 2002. Available at: <<http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2010-1/100109.pdf>> Accessed on: Jun. 23, 2013.
- FIGUEIREDO, L.G.G.; ELER, J.P.; FERAZ, J.B.S. et al. Componentes de variância para área de olho de lombo e espessura de gordura subcutânea. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3., 2000, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBMA, 2000. p.385-387.
- GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. [2009]. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programs. **Nature Review Genetics**, v.10, p.381-391, 2009. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448663>> Accessed on: Jun. 19, 2013.
- HELD, P. [2008]. Measure Your Purity: Assessment of Nucleic Acid Purity via UV Absorbance. **G.I.T. Laboratory Journal**, v.12, 2008. Available at: <http://www.biotekinstrument.com/resources/docs/Measure_Your_Purity_GIT_MayJune2008.pdf> Accessed on: Jun. 19, 2013.