

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Estudo de associação genômica para ingestão e consumo alimentar residual em bovinos Nelore¹

Miguel Henrique de Almeida Santana², Yuri Tani Utsunomiya³, Luiz Lehmann Coutinho⁴, José Fernando Garcia⁵, Heidge Fukumasu⁶, José Bento Sterman Ferraz⁶

¹Trabalho financiado pela FAPESP

²Pós-Graduação em Qualidade e Produtividade Animal – FZEA/USP, Pirassununga. Bolsista FAPESP e-mail: mhasantana@usp.br

³Pós-Graduação em Medicina Veterinária – FCAV/UNESP, Jaboticabal. Bolsista FAPESP e-mail: yutunomiya@gmail.com

⁴Departamento de Zootecnia - ESALQ, Piracicaba. e-mail llcoutho@usp.br

⁵Departamento de Medicina Veterinária– FOA/UNESP, Araçatuba. e-mail: jfgarcia@fmva.unesp.br

⁶Departamento de Medicina Veterinária – FZEA/USP, Pirassununga. e-mail: fukumasu@usp.br, e jbferraz@usp.br

Resumo: O objetivo desse trabalho foi realizar o estudo de associação de amplo genoma (GWAS) para ingestão de matéria seca (IMS) e consumo alimentar residual (CAR) e assim identificar regiões cromossômicas relacionadas com essas variáveis. Dados de IMS e de CAR de 675 bovinos machos da raça Nelore foram utilizados como fenótipo no teste de associação. A genotipagem foi realizada com micro-arranjos de média densidade de SNPs (BovineSNP50) e estes foram submetidos a um controle de qualidade antes do GWAS. O teste realizado para GWAS foi o GRAMMAR-Gamma e os resultados demonstrados em *Manhattan Plots*. Esse estudo demonstrou muitos SNPs associados ($P < 0,01$) com as variáveis estudadas e esses SNPs estão localizados ao longo de todo o genoma de bovinos Nelore. Essas regiões devem ser melhor estudadas para melhor compreensão dos genes e regiões cromossômicas que têm influência na ingestão e no consumo alimentar residual.

Palavras-chave: *Bos primigenius indicus*, consumo de matéria seca, eficiência alimentar, GWAS, SNP

Genome-wide association study for feed intake and residual feed intake in Nelore cattle

Abstract: The aim of this work was the genome-wide association study (GWAS) for dry matter intake (DMI) and residual feed intake (RFI) and thus identify chromosomal regions associated with them. Data from DMI and RFI of 675 Nelore were used as the phenotype in association test. Genotyping was performed with SNPs medium density microarrays (BovineSNP50) and these were subjected to quality control before the GWAS. The GWAS was performed with the GRAMMAR-Gamma test and results shown in *Manhattan Plots*. This study demonstrated many associated ($P \leq 0.01$) SNPs with the variables and these SNPs are located throughout the genome of Nelore. These regions should be further studied to better understand the genes and chromosomal regions that influence feed intake and residual feed intake.

Keywords: *Bos primigenius indicus*, dry matter intake, feed efficiency, GWAS, SNP

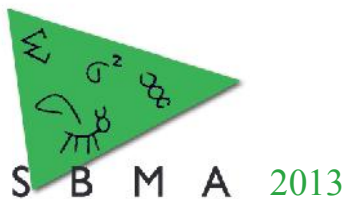
Introdução

Nos últimos anos tem-se dado importância cada vez maior para a ingestão e eficiência alimentar, para bovinos da raça Nelore no Brasil. Esse fato ocorreu devido à preocupação com os custos de produção, redução de impacto ambiental e com a necessidade de aumento da produtividade da bovinocultura de corte. Aliada a essa necessidade, os avanços nos estudos genômicos propiciaram ferramentas robustas capazes de realizar a prospecção veloz e automatizada de muitos marcadores de nucleotídeo único (SNPs) e associar esses marcadores a características de interesse econômico. Esses estudos podem ser interessantes tanto do ponto de vista do melhoramento animal, para uma possível seleção genômica, como também para identificar as regiões que têm influência nessas características.

Várias metodologias frequentistas, semi-paramétricas e bayesianas foram propostas para a realização dessas associações. Alguns trabalhos com painéis de 10 mil SNPs foram realizados na tentativa de encontrar SNPs associados com o consumo alimentar residual (Barendse et al., 2007). O objetivo desse estudo é associar os SNPs contidos em um painel de média densidade (BovineSNP50) com a ingestão e consumo alimentar residual e verificar as regiões cromossômicas que influenciam nessas variáveis em bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado a partir de uma parceria do Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia (GMAB) com o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, o Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA) da Escola Superior de



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Agricultura Luiz de Queiroz e também o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP.

Um total de 675 bovinos (138 novilhos castrados e 537 tourinhos) da raça Nelore foram avaliados e tinham em média 393 ± 20 kg de peso e 22 ± 2 meses de idade no início da avaliação. Dados de ganho de peso e de ingestão de matéria seca (IMS) desses animais foram utilizados para cálculo do consumo alimentar residual (CAR) e posteriormente junto com a ingestão a IMS foram usados como fenótipo para associação (GWAS). As variáveis fenotípicas foram avaliadas quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e heterogeneidade de variância pelo teste de Levene.

O DNA genômico desses animais foi extraído a partir de pelos e sangue e o mesmo foi testado para qualidade e quantificado no LMMD, após essa etapa esse material levado para o LBA para ser analisado no equipamento HiScanSQ® (Illumina Inc, San Diego, CA, EUA) pelo protocolo *Infinium Assay II* para o chip comercial utilizado (BovineSNP50). Após a genotipagem, os dados passaram por controle de qualidade (CQ) antes do GWAS. Os parâmetros utilizados para isso foram: cálculo de distância genética, correlação dos *SNPs*, análises de coordenadas principais (*PCoA*), localização cromossômica, *call rate* dos *SNPs*, *call rate* da amostra, menor frequência alélica (*MAF*) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

O teste de associação realizado foi o método frequentista GRAMMAR-Gamma (Svishcheva et al., 2012) com a adição de idade como covariável e condição sexual (inteiro ou castrado) como efeito fixo no modelo poligênico. Os resultados do GWAS foram apresentados em forma de *Manhattan Plots* com o teste de significância plotado em cologarítimos dos valores de significância (P) ajustados pelo teste de Bonferroni. Os testes dos fenótipos, CQ, GWAS e os plots foram realizados no pacote estatístico R com a utilização da biblioteca GenABEL (Aulchenko et al., 2007).

Resultados e Discussão

No CQ, de um total de 54609 de *SNPs* contidos no chip comercial, 1.723 (3,15%) estavam em cromossomos não-autossômicos (1.171 sexuais, 552 sem identificação cromossômica), 5076 foram excluídos por serem altamente correlacionados ou por terem a mesma coordenada genômica. Um total de 6.611 *SNPs* (12,10%) e 3 amostras foram excluídas por baixo *call rate* ($< 0,90$), 13728 (25,14%) foram excluídos por baixa *MAF* ($< 2\%$) e 1.674 (3,07%) foram retirados por EHW ($< 1 \times 10^{-5}$). Os dados finais para GWAS continham 672 amostras e 28.231 *SNPs*.

Nas Figuras 1 e 2 abaixo estão apresentados os gráficos do tipo *Manhattan Plot* da associação dos *SNPs*, separados por cromossomos, com a ingestão alimentar (Figura 1) e com o consumo alimentar residual (Figura 2).

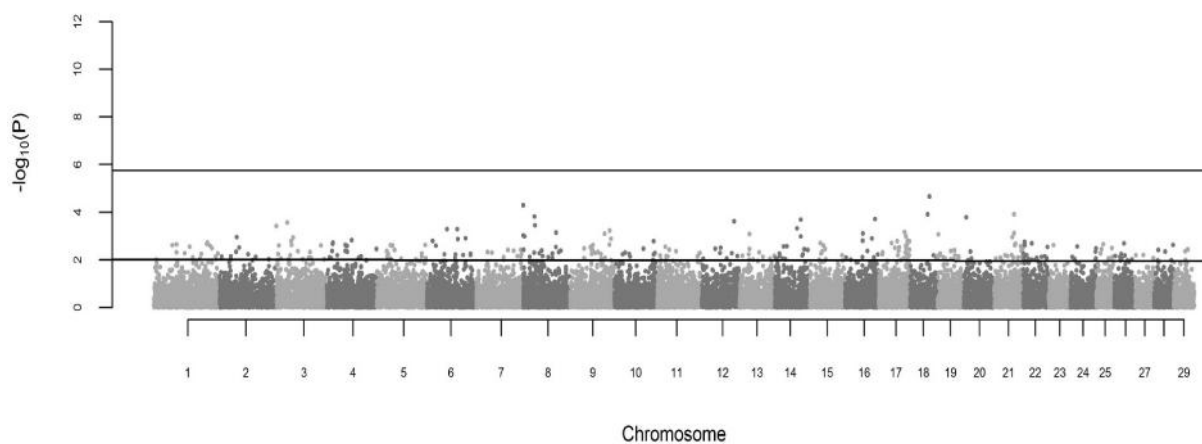


Figura 1. *Manhattan Plot* dos valores de P ajustados por Bonferroni (linha superior) e de P 0,01 (linha inferior) da associação (GRAMMAR-Gamma) dos *SNPs* com a ingestão de matéria seca

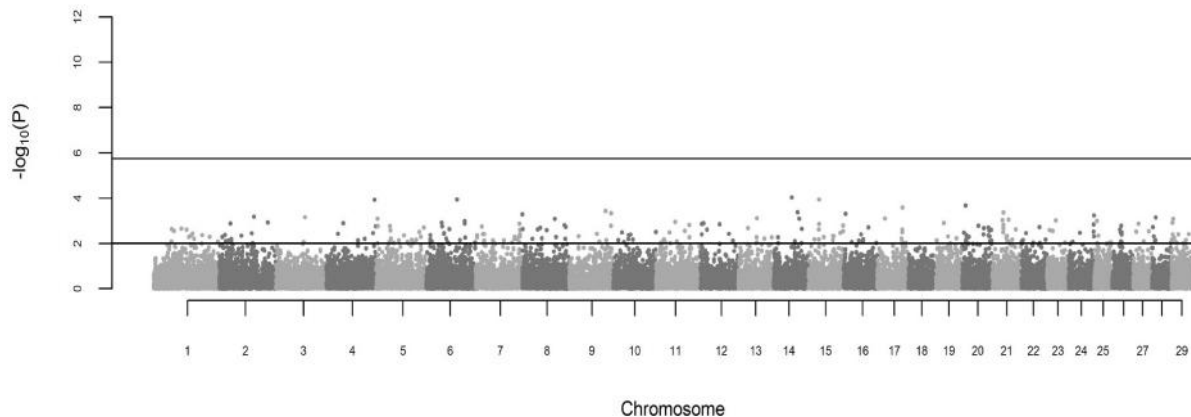
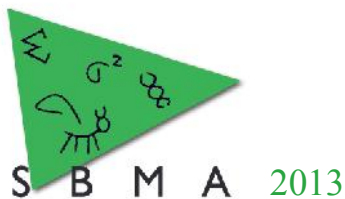


Figura 2. *Manhattan Plot* dos valores de P ajustados por Bonferroni (linha superior) e de P 0,01 (linha inferior) da associação (GRAMMAR-Gamma) dos *SNPs* com o consumo alimentar residual

De maneira geral, as duas figuras não mostram *SNPs* com significância muito alta e regiões genômicas altamente associadas com os fenótipos avaliados, isso quando os mesmos são ajustados para o teste de Bonferroni. Os picos observados foram de média e baixa magnitude e se encontram difusos ao longo dos cromossomos, esse é um indicativo de que ambas características são controladas por diversos genes e que muitos *SNPs* têm efeito baixo e intermediário sobre elas, vários deles foram associados a 1% de significância (Figuras 1 e 2).

Rolf et al. (2010) realizaram *GWAS* em 1500 animais da raça Angus para eficiência alimentar com o mesmo chip comercial de 50 mil *SNPs* e incorporaram os dados genômicos nas matrizes de avaliação genética, observando um aumento nas acurácias das estimativas genéticas. Em outro estudo com genotipagem com o mesmo chip comercial, Snelling et al. (2011) testaram as associações dos *SNPs* com ingestão de alimentos, eficiência alimentar, além de verificarem o impacto da inclusão das informações genômicas nos méritos genéticos de animais cruzados e concluíram que os *SNPs* fortemente associados ($P < 0,001$) foram adequados em descrever as variações genéticas aditivas. Mujibi et al. (2011) também encontraram vários *SNPs* associados com ingestão e consumo alimentar residual e citou uma vasta gama de proteínas que são codificadas nas regiões na qual esses *SNPs* estão localizados.

Conclusões

O estudo de associação de amplo genoma para ingestão e eficiência alimentar mostrou muitos marcadores moleculares ao longo do genoma que tem influência nessas características. Essas regiões cromossômicas parecem estar relacionadas com as variáveis estudadas.

Esses marcadores moleculares do tipo *SNP* devem ser estudados com o intuito não somente de usar eles para uma possível seleção genômica, como também para o melhor entendimento dos processos fisiológicos envolvidos nessas características fenotípicas.

Literatura citada

- AULCHENKO, Y.S. et al. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. **Bioinformatics**, v.23, p.1294–1296, 2007.
- BARENDSE, W. et al. A validate whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**, v.176, p.1893-1905, 2007.
- MUJIBI, F.D.N. et al., 2011 Associations of marker panel scores with feed intake and efficiency traits in beef cattle using preselected single nucleotide polymorphisms. **Journal of Animal Science**, v.89, p.3362–3371, 2011.
- ROLF, M.M. et al. Impact of reduced marker set estimation of genomic relationship matrices on genomic selection for feed efficiency in Angus cattle. **BMC Genetics**, p.11-24, 2010.
- SNELLING, W.M. et al. Partial-genome evaluation of postweaning feed intake and efficiency of crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1731-1741. 2011.
- SVISHCHEVA, G.R. et al. Rapid variance components based method for whole-genome association analysis. **Nature Genetics**. v.44, p.1166–1170, 2012.