

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

Associação genômica entre polimorfismos de nucleotídeo único e marmorização avaliada no período *post mortem* em bovinos da raça Nelore¹

Carolyn Aboujaoude², Lucia G. Albuquerque³, Luciana Takada⁴, Rafael Espigolan⁴, Fabieli L. B. Feitosa⁵, Fernando Baldi⁶

¹Trabalho financiado pela FAPESP

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

³Professora Titular – UNESP, Jaboticabal. Pesquisadora do CNPq e do INCT-CA

⁴Pos-doutoranda, Departamento de zootecnia – Unesp, Jaboticabal.

⁵Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – Unesp, Jaboticabal.

⁶Professor, pesquisador, Departamento de zootecnia – Unesp, Jaboticabal. e-mail: fernandobaldiuy@gmail.com

Resumo: O objetivo deste trabalho foi estudar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único no genoma de bovinos da raça Nelore para marmoreio avaliado no período *post mortem*. Foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de 727 machos da raça Nelore entre a 12ª e 13ª costela 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 ($p < 1,12 \times 10^{-7}$) não foram constatados SNPs significativos. Os principais picos de SNPs significativos ($p < 0,001$), para AOL foram observados nos cromossomos 3, 14, e 18.

Palavras-chave: carcaça, carne, marmoreio, melhoramento genético, produtividade

Genome association between single nucleotide polymorphisms with marbling evaluated in *post mortem* period in Nelore cattle

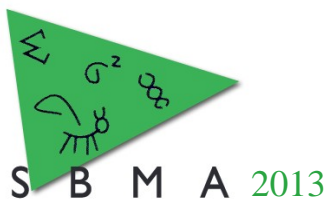
Abstract: The aim of this study was to investigate the association of single nucleotide polymorphisms in the genome of Nelore cattle with marbling evaluated during post mortem. 727 *Longissimus dorsi* muscle samples from the Nelore males were collected between the 12th and 13th ribs of the left half 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 3, 14, and 18.

Keywords: carcass, genetic improvement, marbling, meat, productivity

Introdução

A taxa de gordura intramuscular, conhecida como marmoreio, é uma das características com relação direta ao valor da carne bovina. Esta característica é responsável pelos principais aspectos buscados pelo consumidor, como textura, sabor e influencia na maciez. O aumento das taxas de gordura intracelular leva a uma melhora significativa na palatabilidade da carne (Costa et al, 2001). O estudo da associação genômica ampla (GWAS) realiza uma análise de associação utilizando variações existentes por todo o genoma, principalmente nos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) junto aos fenótipos e informações de parentescos (Goddard & Hayes, 2009). Estudos de associação genômica ampla, utilizando painéis de alta densidade, ainda não são tão explorados em animais de raças zebuínas. A utilização das informações genômicas permitirá ganhos genéticos representativos nas características de carcaça, que são de difícil e/ou alto custo de mensuração devido a expressão tardia. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único no genoma de bovinos da raça Nelore com marmoreio avaliado no período *post mortem*.

Material e Métodos



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

Foram utilizados 727 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 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 12ª e 13ª 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 à 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 do marmoreio foi realizada pelo método escala de graduação visual (USDA - Quality and Yield Grade), adaptado ao padrão de marmoreio encontrado no rebanho nacional, variando de 0 a 9 graus. O escore médio para marmoreio foi de $3,12 \pm 0,39$, sendo o mínimo de 2,10 e o máximo 3,90.

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 absorvância 260/280. 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 consistência dos dados genômicos e os genótipos. Foram considerados todos os 29 autossomos bovinos (BTA).

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 20.607 SNPs significativos ao $p < 0,05$, 4.128 ao $p < 0,01$ e 446 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 1%. Os principais picos de SNPs significativos ($p < 0,001$) para marmoreio foram observados nos cromossomos 3, 14, e 18, enquanto os de menor número de SNP foram os cromossomos 9, 11 e 26 (Figura 1).

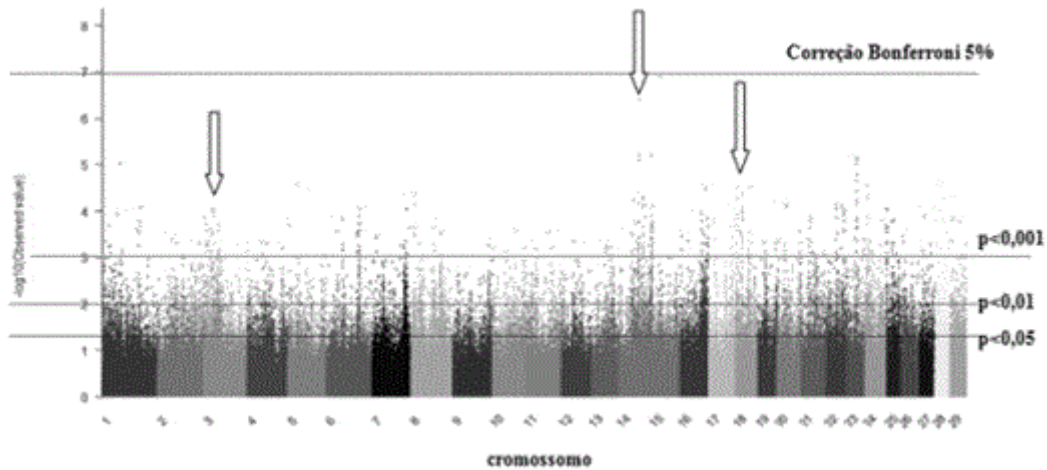


Figura 1 Manhattan plot dos resultados da associação genômica para marmoreio em bovinos da raça Nelore.

Vários estudos com outras raças mostraram associação desta característica ao cromossomo 14, que é condizente com os resultados encontrados relativo à raça Nelore. Casas et al. (2003) encontraram em cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus*, locos de características quantitativas (QTL) associados a marmoreio na posição 47cM do cromossomo 14 e Taylor e Schnabel (2004: <http://animalgenomics.missouri.edu/>) encontraram QTLs nesta mesma posição na raça Angus. Casas et al. (2001) encontram na raça *Belgian Blue*, QTLs significativos para marmoreio no cromossomo 3, com $F_{P\&R} = 0.025$.

Conclusões

Foram identificados marcadores do tipo SNPs afetando o marmoreio da carne na raça Nelore nos cromossomos 3, 14, e 18. Isso facilitará a seleção de animais com melhor qualidade de carne.

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. [2003]. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14677852>> Accessed on: Jul. 03, 2013.
- CASAS, E.; STONE, R. T.; KEELE, J. W. et al. [2000]. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. **Journal of Animal Science**. Available at: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/54380530/2001040854.pdf>> Accessed on: Jul. 03, 2013.
- COSTA, E.C.; RESTLE, J.; BRONDANI, I.L. et al. Composição física da carcaça, qualidade da carne e conteúdo de colesterol do músculo *Longissimus dorsi* de novilhos Red Angus superprecoce, terminados em confinamento e abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.417-428, 2002 (supl.)
- 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.