

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Estudo da associação entre polimorfismos de base única e maciez da carne em bovinos Nelore utilizando painéis de alta densidade¹

Rafael Espigolan², Fernando Baldi³, Luis Artur Loyola Chardulo⁴, Rafael Lara Tonussi⁵, Daniel Gustavo Mansan Gordo⁶, Lucia Galvão de Albuquerque⁷

¹Trabalho financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Processo nº 2009/16118-5

²Aluno de doutorado em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista da CAPES. e-mail: espigolan@yahoo.com.br

³Professor Assistente Doutor do Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP

⁴Professor Assistente Doutor no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu

⁵Aluno de doutorado em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista da CAPES

⁶Aluno de doutorado em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista do CNPq

⁷Professora Titular – UNESP, Jaboticabal. Pesquisadora do CNPq e do INCT-CA. e-mail: lgalb@fcav.unesp.br

Resumo: O objetivo desse estudo foi analisar a associação entre marcadores do tipo SNP e a maciez da carne de bovinos da raça Nelore, empregando um painel de alta densidade. Foi utilizado um total de 740 machos da raça Nelore nascidos em 2008 e 2009. O abate dos animais ocorreu em plantas frigoríficas comerciais e as medidas de maciez da carne foram realizadas em amostras do músculo *Longissimus dorsi* obtidas entre a 12^a e 13^a costelas. A genotipagem dos animais foi realizada utilizando o painel de alta densidade de marcadores, Illumina BovineHD BeadChip, com 777.962 marcadores do tipo SNP cobrindo todo o genoma. Após o controle de qualidade, um total de 446.986 marcadores restou para a realização da associação genômica. As análises de associação foram realizadas considerando apenas um marcador por vez. Os efeitos fixos considerados no modelo foram: marcador SNP (0, 1 e 2), grupo de contemporâneos e data de abate (15 níveis) e, como covariável, o efeito linear da idade de abate. Os grupos de contemporâneos foram definidos como: ano, fazenda e grupo de manejo ao nascimento, além de grupo de manejo à desmama e ao sobreano. Foi constatado que existem vários SNPs significativos que afetam a maciez da carne. Mais estudos devem ser direcionados para o cromossomo 13, no qual foi identificado 105 SNPs significativos ($p < 0,001$). Nos cromossomos 12 e 11 foram localizados 48 e 48 SNPs significativos, respectivamente.

Palavras-chave: associação genômica, bovinos de corte, marcadores SNP, qualidade da carne

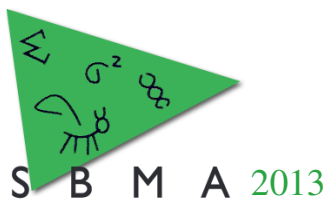
Study of the association between single nucleotide polymorphisms and meat tenderness in Nellore cattle using high density panels

Abstract: The objective of this work was to analyze the genomic association between SNP markers and meat tenderness in Nellore cattle using high density panels. A total of 740 Nellore males born in 2008 and 2009 were used. The animals were slaughtered in commercial slaughterhouses and meat tenderness was measured on samples of *Longissimus dorsi* muscle taken between the 12th and 13th ribs. The genotyping was performed using the high density panel, Illumina BovineHD BeadChip, with 777,962 SNP markers throughout the genome. After the quality control, 446,986 markers were available for genomic association. Association analyzes was conducted considering only one marker at a time. The fixed effects in the model were: SNP marker (0, 1 and 2), contemporary group, date of slaughter (15 levels) and slaughter age as covariates (linear effect). The contemporary groups were defined as: year, farm and management group at birth, and management group at weaning and yearling. Several significant SNPs affecting meat tenderness were found. More studies should be directed to chromosome 13, which was identified 105 significant SNPs ($p < 0.001$). On chromosomes 12 and 11 were found 48 and 48 significant SNPs, respectively.

Keywords: beef cattle, genomic association, meat quality, SNP markers

Introdução

O grande foco nos programas de melhoramento genético do Zebu tem sido as características de crescimento e poucos programas dão alguma ênfase a características relacionadas à qualidade da carne. Esta característica torna-se importante, quando cerca de 80% do rebanho brasileiro é composto por raças zebuínas, produzindo carcaças com menor maciez da carne. Na associação genômica ampla (GWAS) utilizam-se variações existentes (polimorfismos de base única, SNPs) em todo o genoma, em conjunto



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

com o fenótipo e informações de pedigree, para realizar uma análise de associação e identificar genes que são importantes para características de interesse (Zhang et al., 2012). Desse modo, o objetivo desse estudo foi analisar a associação entre marcadores do tipo SNP e a maciez da carne no genoma de bovinos da raça Nelore empregando um painel de alta densidade.

Material e Métodos

Foi utilizado um total de 740 machos da raça Nelore nascidos em 2008 e 2009, filhos de 108 touros e pertencentes a três programas de melhoramento genético (Conexão Delta G, PAINT e Nelore Qualitas). Os grupos de contemporâneos (GC) foram definidos como: ano, fazenda e grupo de manejo ao nascimento, e grupo de manejo à desmama e ao sobreano, perfazendo um total de 117 GC com no mínimo três animais. O abate dos animais ocorreu em plantas frigoríficas comerciais e as carcaças eram resfriadas por, no mínimo, 24 horas. Após o resfriamento e estabelecimento pleno da *rigor mortis* foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* com osso (espessura aproximada de 2,54 cm) entre a 12ª e 13ª costelas da meia-carcaça esquerda de cada animal e realizado o ensaio de força de cisalhamento, segundo procedimento padronizado e proposto por Wheeler *et al.* (1995).

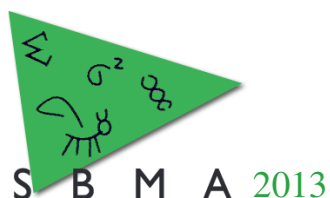
A extração do DNA foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue Kit da Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segundo instruções do fabricante. A genotipagem foi feita no Departamento de Tecnologia (UNESP, Câmpus de Jaboticabal) utilizando-se o painel BovineHD BeadChip de alta densidade, segundo protocolo 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 obtenção dos genótipos. O controle de qualidade dos dados e a preparação dos genótipos foram realizados no *prompt* de comando do 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 de SNPs utilizados para o controle de qualidade dos dados genômicos foram: $MAF < 0,05$, heterozigose $> 0,30$, $Call\ Freq < 0,93$, intensidade média do $cluster > 0,30$, remoção dos cromossomos sexuais e de marcadores com baixa frequência A/B. Desse modo, restaram 446.986 marcadores disponíveis para a análise de 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 (*Statistical Analysis System*, versão 9.2). Os efeitos fixos considerados no modelo foram: marcador SNP, grupo de contemporâneos e data de abate (15 níveis) e, como covariável, efeito linear da idade de abate. A taxa de falsos positivos (FPR) foi calculada segundo a fórmula: $FPR = (m * p) / n$, em que m é o número de marcadores testados (marcadores que passaram no controle de qualidade), p é o nível de significância e n consiste no número de marcadores significativos (nível de significância $< p$) para a maciez da carne.

Resultados e Discussão

Aplicando a correção de testes múltiplos de Bonferroni ($p < 1,12 \times 10^{-7}$), não foram constatados SNPs significativos. Entretanto, foram encontrados 5.328 ($p < 0,01$) e 24.333 ($p < 0,05$) marcadores SNP associados com a maciez da carne. Assim, neste trabalho optou-se por utilizar o nível de significância de $p < 0,001$, sob o qual foram encontrados 644 SNPs associados com a característica em estudo (Figura 1). A taxa de FPR, considerando os SNPs significativos ($p < 0,001$), foi de 69%. Essa taxa é inferior à encontrada por Bolormaa et al. (2011) que genotiparam 940 bovinos de diferentes raças para maciez da carne e observaram FPR de 84%. Porém, os autores utilizaram painel de SNPs com aproximadamente 54.000 marcadores e p valor de $p < 0,001$.

Os principais picos de SNPs significativos ($p < 0,001$) foram observados nos cromossomos 13, 12 e 11 (Figura 1). O cromossomo 13 foi o que apresentou maior concentração de marcadores SNPs significativos (105 SNPs), enquanto que os de menor número foram os cromossomos 19 (8 SNPs) e 26 (7 SNPs). No cromossomo 13, 105 marcadores SNPs foram significativos ($p < 0,001$), entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que reportem QTL para a maciez da carne nesse cromossomo. No presente trabalho, foram observados 53 SNPs significativos ($p < 0,001$), no cromossomo 13, localizados muito próximos entre si (68.071 kb a 68.986 kb). Estes resultados são sugestivos de ocorrência de possíveis QTL na região desse cromossomo. No cromossomo 12 foram encontrados 48 SNPs



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

significativos ($P < 0,001$) para a maciez da carne, sendo que 15 destes estavam fisicamente muito próximos (33.340 kb a 33.776 kb). Resultados semelhantes foram relatados por Bolormaa et al (2011), que encontraram 9 SNPs significativos ($p < 0,001$) no cromossomo 12 para a maciez da carne, trabalhando com 940 bovinos de diferentes raças (Angus, Hereford, Murray Grey, Shorthorn, Brahman, Santa Gertrudis) genotipados com o Illumina BovineSNP50. O cromossomo 11 também apresentou 48 marcadores SNPs significativos para a maciez da carne ($p < 0,001$) e 15 destes estavam fisicamente próximos (40.984 kb a 41.233 kb).

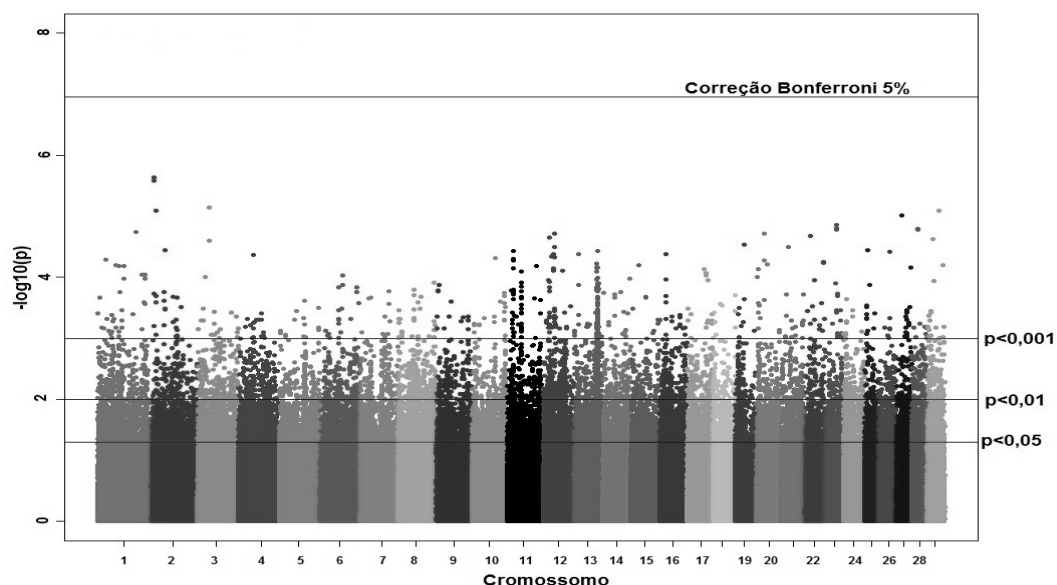


Figura 1. Manhattan plot dos resultados da associação genômica para maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Valores acima de $-\log P > 3$ são equivalentes a $p < 0,001$.

Os resultados do presente estudo diferem dos reportados por Davis et al. (2007) que encontraram QTL associados a maciez da carne no cromossomo 8 em uma população de 598 animais da raça Charolês, Brahman e Belmont Red, utilizando para isso 183 marcadores cobrindo todo o genoma bovino. Os autores reportaram, ainda, QTL no cromossomo 7 e 10 para maciez da carne que ainda não haviam sido localizados.

Conclusões

O presente trabalho constatou que existem vários SNPs significativos que afetam a maciez da carne. Mais estudos devem ser direcionados para o cromossomo 13, no qual foi identificado 105 SNPs significativos ($p < 0,001$). Nos cromossomos 12 e 11 foram localizados 48 e 48 SNPs significativos, respectivamente.

Literatura citada

- BOLORMAA, S.; PORTO NETO, L.R.; ZHANG, Y.D. et al. A genome-wide association study of meat and carcass traits in Australian cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2297-2309, 2011.
- DAVIS, G.P.; MOORE, S.S.; DRINKWATER, R.D. et al. QTL for meat tenderness in the *M. longissimus lumborum* of cattle. **Animal Genetics**, v.39, p.40-45, 2007.
- WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. **Clay Center: Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA**, 7p., 1995.
- ZHANG, H.; WANG, Z.; WANG, S. et al. Progress of genome wide association study in domestic animals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.3, p.26, 2012.