

DÉBORA MARTINS PAIXÃO

**ESTUDOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS, DE  
EXPRESSÃO GÊNICA E TESTE DE PATERNIDADE EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada  
à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das Exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Zootecnia, para a obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DÉBORA MARTINS PAIXÃO

**ESTUDOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS, DE  
EXPRESSÃO GÊNICA E TESTE DE PATERNIDADE EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada  
à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das Exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Zootecnia, para a obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:

---

Prof. Paulo Sávio Lopes

---

Pesq. Samuel Rezende Paiva

---

Prof. Fabyano Fonseca e Silva

---

Prof. Sérgio H. Bronmonschenkel

---

Prof<sup>a</sup>. Simone E.F. Guimaraes

“Somente aqueles que arriscam ir mais longe sabem o quão longe  
alguém pode ir.”

T.S.Elliot

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por me dar forças e confiança para sempre seguir a diante.

Aos meus pais pelo carinho e apoio incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia por oportunizar a realização de mais esta etapa da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora, Professora Simone Eliza Facioni Guimarães, pela orientação, confiança, oportunidades, incentivo e ensinamentos.

Aos membros da banca de defesa.

Aos demais professores, funcionários e alunos do Departamento de Zootecnia (DZO), pelo companheirismo, pelo incentivo, pela amizade e por fazer do DZO um ambiente de agradável convívio.

Aos meus colegas do LABTEC pela amizade e paciência.

Aos amigos de longa data pela amizade, pelo incentivo, pelo convívio e por todos os momentos que compartilhamos no decorrer desses anos.

## BIOGRAFIA

Débora Martins Paixão, filha de Fernando Antônio Paixão e Efigênia Martins Paixão, nasceu em 25 de março de 1980, em Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil.

No ano de 2000, iniciou o curso de Zootecnia, pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, onde foi bolsista de iniciação científica, acompanhando e conduzindo pesquisas junto ao Programa de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da UFV.

Em março de 2004, graduou-se em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, na área de Melhoramento Genético Animal.

Em 26 de fevereiro de 2007, submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2007, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, na área de Melhoramento Genético Animal.

Em 24 de setembro de 2010, submeteu-se ao exame final de defesa de tese para obtenção do título de *Doutorado Scientiae* em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

## Sumário

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Mapeamento de QTL nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X em suínos: características de carcaça e qualidade de carne .....	5
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> -.....	6
INTRODUÇÃO .....	7
MATERIAL E MÉTODOS .....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
CONCLUSÕES.....	21
AGRADECIMENTOS .....	21
REFERÊNCIAS .....	21
Detecção de Locos de Características Quantitativas nos cromossomos 1,2,3,12,14,15 e X de Suínos: características de desempenho .....	25
<b>RESUMO</b> .....	25
<b>ABSTRACT</b> .....	26
INTRODUÇÃO .....	27
MATERIAL E MÉTODOS .....	28
RESULTADOS.....	31
CONCLUSÃO .....	36
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
Avaliação da expressão de genes selecionados <i>in silico</i> em regiões de QTL associados a características de qualidade de carne.....	40
<b>RESUMO</b> .....	40
<b>ABSTRACT</b> .....	41
INTRODUÇÃO .....	42
MATERIAL E MÉTODOS .....	43
<b>Animais, coleta e extração do mRNA</b> .....	43
<b>Análise <i>in silico</i></b> .....	43
<b>Teste de eficiência e RT-qPCR</b> .....	45
<b>Análise Estatística</b> .....	46
RESULTADOS .....	47
DISCUSSÃO .....	51
CONCLUSÃO .....	60
REFERÊNCIAS .....	61

Avaliação de marcadores microssatélites para testes de paternidade e rastreabilidade em suínos.....	66
<b>Resumo</b> .....	66
Abstract.....	67
INTRODUÇÃO .....	68
MATERIAL E MÉTODOS .....	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
REFERÊNCIAS .....	75
CONCLUSÃO GERAL .....	77
REFERÊNCIA .....	78



## RESUMO

PAIXÃO, Débora Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010.  
**Estudos de Características Quantitativas, de Expressão Gênica e Teste de Paternidade em Suínos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-orientadores: Paulo Sávio Lopes e Samuel Rezende Paiva.

A realização do presente estudo teve como objetivo mapear 1) QTL nos cromossomos 1, 2, 3, 12,14, 15 e X em uma população F2 de suínos desenvolvida pelo cruzamento de dois reprodutores da raça brasileira Piau com 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain); 2) mapear *in silico* e investigar o nível de expressão de genes candidatos que influenciam a qualidade de carne em suínos; e 3) desenvolver um painel de marcadores microssatélites para testar a paternidade e a origem de suínos. Um total de 20 QTL foram encontrados para características de carcaça e qualidade de carne e oito para características de desempenho, desses, os QTL para maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar, perda por cozimento e idade de abate foram significativos em nível de 5% genômico. A característica espessura de toucinho foi essencialmente associada aos alelos da raça Piau, conhecido como porco tipo banha. Observou-se diferenças de expressão dos genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, IGF2, MyoD1 e S1PR5 entre os grupos genéticos Piau, comercial e cruzados, abrindo perspectivas para maiores estudos, sequenciamento e procura por mutação causal associada a características quantitativas. Informações de paternidade acuradas são fundamentais para a estimativa dos valores genéticos dos animais e assim, assegurar o sucesso dos programas de melhoramento. No presente estudo os 28 marcadores microssatélites avaliados foram altamente informativos, apresentaram estimativas probabilidades de exclusão de paternidade combinada para as situações em que o genótipo da mãe é conhecido ( $P_1$ ) e para a situação em que genótipo da mãe não está disponível ( $P_2$ ) maiores que 99% e podem ser considerados adequados para análises de paternidade e de rastreabilidade em suínos. Os resultados obtidos no presente trabalho e apresentados nos diferentes capítulos foram relevantes e contribuíram com maiores informações a cerca da genômica envolvida no desenvolvimento das características quantitativas de importância econômica avaliadas na produção de suínos, como também mostraram a efetividade de testes de identificação individual de suínos.

## ABSTRACT

PAIXÃO, Débora Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010.  
**Studies on Quantitative Characteristics de Características Quantitativas, of gene expression and Paternity test in pigs.** Adiser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-Advisers: Paulo Sávio Lopes and Samuel Rezende Paiva.

The accomplishment of the present study had as objective: 1) to map Quantitative Trait Loci (QTL) on chromosomes 1, 2, 3, 12, 14, 15 and X in a F<sub>2</sub> pig population developed by mating two Brazilian Piau breed sires with 18 dams from a commercial line (Landrace × Large White × Pietrain); 2) mapping in silico and investigate the level of expression of genes candidates that influence meat quality in pigs; and 3) develop a panel of microsatellite markers for paternity testing and origin of pigs. A total of 20 QTL were identified to carcass and quality traits; and a total of 8 QTL to performance traits, from these, the QTL for higher backfat thickness on the shoulder region, for cooking loss and for slaughter age (days) was significant at the 5% genome-wide level. The backfat thickness trait was mainly associated with the Piau breed allele, known as a fat pig. It was observed in differences in the expressions of the genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, IGF2, MyoD1 and S1PR5 among groups genetic Piau, commercial and crossbred, opening prospects for further studies, sequencing and search for causal mutation associated with quantitative traits. Accurate information of paternity are fundamental to the estimation of breeding values and thus ensure the success of breeding programs. In this study, the 28 microsatellite markers evaluated were highly informative, showed combined exclusion probabilities for the situations where the mother's genotype is known ( $P_1$ ) and the situation where the mother's genotype is not available ( $P_2$ ) greater than 99% and can be considered efficient for paternity and traceability analysis in pigs. The results obtained in this study and shown in the various chapters were relevant and contributed to more information about the genomic involved in the development of quantitative traits of economic importance evaluated in pigs production and also showed the effectiveness of testing for individual identification in pigs.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior exportador mundial de carne suína, e, devido aos programas de genética e nutrição, o suíno moderno apresenta de 55 a 60% de carne magra na carcaça e apenas 1,5 a 1,0 centímetros de espessura de toucinho de acordo com os dados da Abipecs (2010). Contudo, a intensa seleção genética de suínos para produção de carcaça com menor conteúdo de gordura tem provocado efeito negativo na qualidade da carne e, conseqüentemente, a insatisfação dos consumidores (Terra & Fries, 2000).

Segundo Silva (2003a), para um sistema eficiente de produção de suínos, ainda há a necessidade de produzir animais a custos mais baixos e, ao mesmo tempo, mais saudáveis, seguros e criados sob condições de bem estar animal. Podem-se incluir também questões como impacto ambiental, praticidade (seleção assistida por marcadores), ética e origem (rastreabilidade). Dentro deste contexto, a identificação de genes influenciando características economicamente importantes seguida pela seleção assistida por marcadores, pode ser empregada em conjunto com métodos tradicionais de seleção e, assim, aumentar resposta à seleção para características de interesse econômico e, conseqüentemente, produzir sistemas eficientes de produção de suínos.

O primeiro passo na identificação de genes e de polimorfismos causais para características de importância na agricultura e na medicina é a identificação de QTL (*Quantitative Trait Loci*) afetando tais características (Seaton et al, 2002). Em 246 publicações sobre estudos de características quantitativas já foram identificados 5.732 QTL em suínos, correspondendo a 557 características diferentes. Nos cromossomos 1, 2, 3,12,14, 15 e X que são os grupos de ligação avaliados neste estudo já foram encontrados 1322, 493, 200, 150, 190, 163 e 249, respectivamente. Sendo 4.018 QTL associados a características de qualidade de carne (<http://www.animalgenome.org-10/07/2010>).

Com os avanços na Genômica e a importância econômica e biológica dos suínos, várias populações experimentais por meio de cruzamentos de animais de raças selvagens, naturalizadas ou exóticas com animais comerciais; têm sido construídas para mapeamento de QTL e, para a busca de genes associados a características de qualidade de carne, carcaça e desempenho. No site <http://www.animalgenome.org/pigqtlatabase>,

há um inventário completo e atualizado periodicamente sobre a identificação de QTL em suínos.

Segundo De Vries et al. (2000) muitos pesquisadores concluíram que a localização dos genes, responsável pela expressão da característica, é de grande interesse, contudo é uma tarefa difícil, em razão do tamanho da região do QTL e do número de genes que possam estar contido no seu interior.

Os genes candidatos são genes sequenciados e de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com características do desenvolvimento ou da fisiologia (Bryne e McMullen, 1996). Existem diferentes estratégias para o estudo dos genes candidatos. A estratégia comparativa toma como partida locos onde polimorfismos são conhecidos por apresentarem efeito fenotípico em uma espécie e os exploram como candidatos em outras espécies. A estratégia fisiológica concentra-se em polimorfismos nos genes com funções relacionadas diretamente à característica de interesse. Uma associação entre polimorfismos do gene candidato e a característica de interesse é tida como evidência de que o gene está envolvido em seu controle genético (Haley, 1999).

Com a chamada Genética Genômica, que reúne resultados do mapeamento de QTL e de expressão gênica, outra abordagem na procura de genes candidatos pode ser citada (Jansen & Nap, 2001). Aqueles genes que apresentarem diferenças significativas de expressão na geração parental seriam escolhidos como possíveis candidatos posicionais para um fenótipo de interesse. Estudos examinando o transcriptoma do *Longissimus dorsi* em suínos têm identificado mudanças na expressão de genes associados com características de qualidade de carne (Lobjois et al., 2007; Ponsuksili et al, 2008; Kwasiborski et al. 2009; Dai et al, 2009, Tang et al. 2010).

Dentre as técnicas que possibilitam na quantificação da expressão gênica, o método de transcrição reversa em tempo real baseado na técnica de Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (RT-qPCR), têm se mostrado uma poderosa ferramenta (Wong & Medrano, 2005). Na técnica de RT-qPCR, podem ser empregadas como estratégias de quantificação: a absoluta ou a relativa. A quantificação relativa, ou método comparativo, baseia-se na comparação da expressão do gene alvo com a referência interna por meio dos valores de Cq (*quantification cycle*) de cada amostra (Pfaffl et al., 2002). O valor de Cq é o número de ciclos de PCR requerido para que cada curva de amplificação alcance o limiar de detecção; sendo, específico para cada amostra e inversamente proporcional a quantidade inicial do alvo presente na reação (Bustin & Nolan, 2004). Existem vários genes de referências a serem testados e

utilizados em diferentes amostras, segundo Erkens et al. (2006), os genes *ACTB* (*beta actin*), *TBP* (*TATA box binding protein*) e *TOP2B* (*topoisomerase II beta*) são adequados para normalização de genes alvos que se expressão em amostras retiradas de *Longissimus dorsi* ou de células adiposas.

Com o rápido desenvolvimento de técnicas moleculares e com a busca por uma maior eficiência e maior qualidade na produção animal, não só têm crescido o interesse pelo uso de marcadores moleculares na seleção de reprodutores, como no auxílio para identificação de paternidade e até mesmo na identificação do próprio animal. Uma vez que erros de pedigree reduzem o ganho genético (Van vleek, 1970; Ron et al., 1996; Carneiro et al., 1999; Israel e Weller, 2000; Banos et al., 2001; Sanders et al., 2006) e consequentemente geram perdas econômicas.

Segundo, Geldermann (1986), nos programas de melhoramento, mais especificamente de suínos e aves, os erros de identificação ocorrem basicamente no campo, na coleta dos dados e durante o processo de digitação dos mesmos. Em suínos encontram-se painéis de marcadores microssátelites para teste de paternidade analisados em diferentes raças (Silveira et al, 2008; Rohrer et al, 2007; Schwarz et al., 2005; Nechtelberger et al, 2001; Putnová et al, 2003).

O Piau é uma das raças de suínos naturalizada do Brasil. Foram trazidos ao litoral paulista (São Vicente) por Martim Afonso de Sousa em 1532. No início, os porcos brasileiros eram provenientes de cruzamentos entre as raças portuguesas, e não havia preocupação alguma com a seleção de matrizes. Com o tempo, criadores brasileiros passaram a desenvolver raças próprias. Esses suínos são caracterizados por baixo desempenho, pequeno tamanho de leitegada, rusticidade, adaptabilidade a condições pobres de manejo e alimentação e que se destacam pelo grande acúmulo de gordura subcutâneo (Guimarães & Lopes, 2001).

Diante da grande importância da produção suína tanto no mercado interno como no mercado externo, na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, em 1998, foi desenvolvida uma população F2 por meio do cruzamento de animais da raça naturalizada Piau com animais comerciais, referência para o mapeamento de QTL e associação de genes a características de desempenho, carcaça e qualidade de carne. Para essa população, mapas de ligação foram construídos e QTL foram mapeados no cromossomo 4 (Silva et al, 2008, 2009), no cromossomo 6 (Pires et al, 2006, 2007, 2008), nos cromossomos 16, 17 e 18 (Paixão et al, 2008a,b), nos cromossomos 5, 7 e 8

(Sousa et al, 2008 ), nos cromossomos 9, 10, 11 (Pinto et al, 2008). Polimorfismo de base única associados a características econômicas foram encontrados para o gene da leptina (Peixoto et al, 2009), hormônio de crescimento (Faria et al, 2006) e gene halotano (Band, 2005a,b). Em animais puros e cruzados: a expressão dos genes p53 foi testado para características reprodutivas (Silva et al., 2010), o gene TLR6 foi associado a resistência à doença (Sousa et al, 2010) e a expressão de nove genes com diferentes funções no músculo suíno foram correlacionados com gordura intramuscular (Serão et al, 2010).

Nesse contexto, objetivou-se realizar a identificação de genes e melhor entendimento dos fenótipos produtivos de suínos. Para alcançar esse propósito, têm-se como objetivos específicos do presente trabalho: 1) mapear QTL nos cromossomos 1, 2,3,12,14, 15 e X na população F2 acima descrita; 2) investigar o nível de expressão de genes mapeados *in silico* a partir de informação de regiões de QTL associados a característica de qualidade de carne no cromossomo 1 e no cromossomo 2 de suínos e 3) desenvolver um painel de marcadores microssatélites para testar a paternidade e a origem de suínos de diferentes raças e linhas. Os resultados serão apresentados a seguir em quatro capítulos.

## CAPÍTULO I

### **Mapeamento de QTL nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X em suínos: características de carcaça e qualidade de carne**

**RESUMO** - A realização do presente estudo teve como objetivo mapear *Quantitative Trait Loci* (QTL) de carcaça e qualidade de carne em uma população F2 de suínos desenvolvida pelo cruzamento de dois reprodutores da raça brasileira Piau com 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain). O mapa de ligação para essa população foi construído após a genotipagem de 684 animais para 35 marcadores microssatélites. Os marcadores foram considerados adequados para estudos de características quantitativas quando analisado o conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os dados foram analisados pelo mapeamento por intervalo no programa GridQTL usando o sexo, lote e genótipo halotano como efeitos fixos e peso de carcaça ao abate como covariável. Um total de 20 QTL foram encontrados, desses, os QTL para maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar e perda por cozimento foram significativos em nível de 5% genômico. A característica espessura de toucinho foi essencialmente associada aos alelos da raça Piau, conhecido como porco tipo banha. As informações dos QTL significativos encontrados servem para futuros estudos de mapeamento fino para identificação de genes a serem usados em conjunto com os métodos tradicionais de seleção, para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento, assim como prover informação a cerca da fisiologia envolvida no desenvolvimento das características quantitativas dos suínos.

Palavras chaves: nível cromossômico, raça Piau, marcador molecular

## **Mapping of QTL on chromosomes 1, 2, 3, 12, 14, 15 and X in pigs: carcass characteristics and quality of carne**

**ABSTRACT** -The accomplishment of the present study had as objective to map Quantitative Trait Loci (QTL) associated to carcass and quality traits in a F2 pig population developed by mating two Brazilian Piau breed sires with 18 dams from a commercial line (Landrace × Large White × Pietrain). The linkage map for this population was constructed after genotyping the 684 animals for 35 microsatellite markers. Estimates of polymorphic information content (PIC) indicated that the microsatellite markers were appropriate for QTL analyses. Data were analyzed by interval mapping using the GridQTL program using sex, batch and halothane genotype as fixed effects and carcass weight at slaughter as a covariable. A total of 20 QTL were identified, from these, the QTL for higher backfat thickness on the shoulder region and cooking loss was significant at the 5% genome-wise level. The backfat thickness trait was mainly associated with the Piau breed allele, known as a fat pig. The information of the significant QTL detected in this study is useful for future fine-mapping studies for identification of genes and might be used together with traditional methods in selection, to improve the efficiency of breeding programs, moreover, this information can also provide new insights to the understanding of the physiology of the quantitative traits in pigs.

Key words: chromosome-wise, Piau breed, molecular marker



## INTRODUÇÃO

Há décadas, a indústria de suínos procura por carcaças com alto rendimento e alta estabilidade durante a estocagem. Entre os consumidores, os aspectos avaliados, em relação à decisão de compra da carne são: cor, maciez e odor. Contudo, a intensa seleção genética de suínos para produção de carcaça com maior rendimento e menor conteúdo de gordura tem provocado efeito negativo na qualidade da carne e, conseqüentemente, a insatisfação dos consumidores (Terra & Fries, 2000).

Uma estratégia para determinar os locos gênicos envolvidos no controle de características quantitativas (QTL) são estudos por meio de associações estatísticas entre marcadores genéticos e a característica de interesse. Existem muitos estudos voltados para a busca de QTL que afetam características de carcaça e de qualidade de carne em suínos (Varona et al., 2002; Sato et al., 2003; Karlskov-Mortensen et al., 2005; Edwards et al., 2008a,b). Para aumentar a possibilidade de identificação de QTL são utilizados cruzamentos divergentes, por meio do inter cruzamento de animais de raças selvagens, nativas ou naturalizadas com animais de raças comerciais (Andersson et al., 1994; Bidanel et al., 2001, Pires et al., 2005; Silva et al., 2008; Paixão et al., 2008a,b).

A detecção de QTL permite identificar no genoma dos animais, regiões onde se encontram genes que controlam parte das diferenças fenotípicas, sendo de grande aplicabilidade na seleção assistida por marcadores, aumentando a resposta à seleção, principalmente das características que são de difícil mensuração, mensuradas em apenas um dos sexos e/ou medidas após o abate, como as características de corte de carcaça e qualidade de carne.

A origem das raças suínas naturalizadas brasileiras é incerta e uma dessas raças desenvolvidas no Brasil foi a Piau. Suínos desta raça são caracterizados por baixo desempenho, pequeno tamanho de leitegada, rusticidade, adaptabilidade a condições pobres de manejo e alimentação e destacam-se pelo grande acúmulo de gordura subcutâneo (Guimarães & Lopes, 2001).

O principal propósito da realização do presente trabalho foi o mapeamento de QTL associados a características de carcaça e qualidade de carne, nos cromossomos SSC1, SSC2, SSC3, SSC12, SSC14, SSC15 e SSCX de suínos de uma população F2 provenientes do cruzamento de machos da raça naturalizada Piau e fêmeas de linhagem comercial.

## MATERIAL E MÉTODOS

A formação da população F2 e a coleta dos dados fenotípicos foram realizadas na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001. Foram construídas inicialmente duas famílias provenientes do cruzamento de dois varrões da raça naturalizada brasileira Piau com 18 fêmeas originadas de linhagem Comercial desenvolvida na UFV selecionada para desempenho (Landrace × Large White × Pietrain). A geração F1 nasceu entre os meses de março e maio de 1999. Dentre os machos F1, foram escolhidos ao acaso 11 varrões, provenientes de diferentes leitegadas, que foram cruzados (monta natural) com 54 fêmeas. Estes animais foram acasalados entre os meses de fevereiro e outubro de 2000 para a produção da geração F2.. Assim, foram obtidos 600 animais F2, divididos em cinco lotes. Maiores detalhes sobre a constituição da população foram descritos por Band et al. (2005a,b), Faria et al. (2006) e Peixoto et al. (2009).

O abate dos animais foi realizado quando o peso médio do lote atingia 65 kg ( $64,9 \pm 6,0$ ) de peso vivo e em média aos  $148,2 \pm 10,5$  dias de idade. Desta forma, as seguintes características de carcaça foram avaliadas na geração F2: rendimento de carcaça com cabeça e pés (RCARC), comprimento de carcaça pelo método brasileiro (MBCC) e pelo método americano (MLC); espessura de toucinho nas posições SH (maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar), UC (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar), UL (espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar), LP (menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar) e P2 (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar).

Na meia-carcaça direita resfriada, na região da última costela, a partir de um corte transversal no carré, mediram-se: ETO (espessura de toucinho, a 6,5 cm da linha dorso-lombar, equivalente à P2) e PROFLOMB (profundidade de lombo, diâmetro do músculo *Longissimus dorsi* sobre uma reta traçada da coluna vertebral serrada até a posição onde foi medida a ETO). A área de olho de lombo (AOL) foi medida em triplicata, com auxílio de um planímetro, no decalque vegetal tomado da seção transversal do músculo *Longissimus dorsi*, na altura da última costela. Além de

espessura do bacon (EBACON), medida imediatamente após a última costela, na altura da divisão carré-bacon.

A meia-carcaça direita foi resfriada a 4°C por 24 horas e, posteriormente, procedeu-se a sua dissecação para se obter os dados das características de cortes: peso total pernil (PP), peso do pernil sem pele e sem capa de gordura (PPL), peso total da copa (PCOPA), peso da copa sem pele e sem capa de gordura (PCOPAL), peso total da paleta (PPA), peso da paleta sem pele e sem capa de gordura (PPAL), peso total do carré (PC), peso do lombo (PL), peso total do bacon (PB), peso das costelas (PCOS), peso total da papada (PAPADA), peso do filezinho (PF) e peso da gordura abdominal (PGA).

Para avaliação da qualidade de carne foram avaliadas as seguintes características: pH medido aos 45 minutos e 24 horas *post-mortem* (pH45, pH24, respectivamente), maciez objetiva (força de cisalhamento - MACIEZ), gordura intramuscular (GORINT), capacidade de retenção de água:perda por gotejamento (GOTEJ), perda por cozimento (COZ) e perda de peso total (PTOT)] e coloração. A coloração foi determinada pelo sistema HUNTER LAB, sendo medidos a luminosidade (L), o índice de vermelho (A) e o índice de amarelo (B), em espectrofotômetro COLORQUEST II, de acordo como descrito por Benevenuto (2001).

O DNA dos animais parentais, F1 e F2 foi extraído de sangue coletado imediatamente após o abate utilizando-se o método de extração por precipitação com sal (Miller et al., 1988). As soluções de DNA para uso foram diluídas na concentração de 25 ng /µL em solução de Tris\_EDTA (Tris-HCL 10 mM- pH 8,0 e EDTA 1 mM- pH 8,0 ) e foram mantidas em geladeira a 4°C . A subsequente análise do DNA genômico foi feita no Laboratório de Genético Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Os *primers* de microssatélites foram doados pelo coordenador do *US Pig Genome (supported by the USDA-Cooperative State Research, Education, and Extension Service through National Research Support)*. Os marcadores microssatélites foram testados em relação a sua amplificação e informatividade; assim 35 marcadores foram selecionados para mapear os cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X.

As amplificações de 684 animais foram feitas em termocicladores MJ Research PTC 100-96, utilizando QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, C.A., EUA). O escoramento dos fragmentos amplificados foi feito utilizando-se o software GenScan

(Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA) por meio de seqüenciador automático ABI PRISM 3700.

As informações contidas em cada loco bem como o grau de polimorfismo dos mesmos (PIC) foram computadas por meio do software CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

Para construção do mapa de ligação dos seis cromossomos autossômicos e o sexual X utilizou-se o software CRIMAP versão 2.4 (Green et al., 1990). Os dados de genótipo, fenótipo e o mapa de ligação gerados foram submetidos ao software GridQTL (Seaton et al., 2006) para detecção de QTL.

No modelo estatístico utilizado, assumiu-se que o QTL é dialélico e com alelos alternativos fixados em cada raça parental. A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada conforme o genótipo dos marcadores, a intervalos de 1 cM ao longo do cromossomo. Essas probabilidades são usadas para se fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL em estudo, para cada animal, como descrito por Haley et al. (1994).

A determinação dos limiares de significância cromossômica ( $\alpha=0,05$  e  $\alpha=0,01$ ) foi feita no software GRIQTL, com 10.000 permutações (Churchill & Doerge, 1994). Os limiares genômicos foram obtidos por meio da correção de Bonferroni (Knott et al., 1998). O intervalo de confiança a 95% (CI95%) para a localização do QTL foi obtido usando a aproximação de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ); e a fração aditiva da variância fenotípica ( $h_Q^2$ ) explicada pelo QTL foi feita conforme descrito por Pérez-Enciso et al. (2000). O seguinte modelo estatístico foi ajustado aos dados:

$$y_{ijkl} = S_i + L_j + H_k + (C_{ijkl} - \bar{C})b + c_a a + c_d d + e_{ijkl},$$

Onde  $y_{ijkl}$  é o fenótipo do suíno  $l$  do sexo  $i$  com genótipo  $k$  pertencente ao lote de nascimento  $j$ ;  $S_i$  é o efeito fixo de sexo  $i$ ,  $i = 1$  (macho), 2 (fêmea);  $L_j$  é o efeito fixo de lote  $j$ ,  $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ;  $H_k$  é o efeito fixo do genótipo do halotano  $k$ ,  $k = 1$  (NN), 2 (Nn, portador);  $(C_{ijkl} - \bar{C})b$  é o ajustamento para as covariáveis (peso da carcaça no abate usada como covariável para as características carcaça; peso da carcaça direita

para as características de corte e, idade ao abate para as características de qualidade);  $e_{ijkl}$  é resíduo.

O valor  $c_a$  é função das probabilidades condicionais do QTL, dado o genótipo dos marcadores, e é calculado da seguinte forma:

$$c_a = P(QQ|Mi) - P(qq|Mi)$$

$$c_d = P(Qq|Mi)$$

Onde  $P(QQ|Mi)$  = probabilidade condicional dos alelos para o QTL serem homozigotos e originários da raça naturalizada Piau;  $P(qq|Mi)$  = probabilidade condicional dos alelos para o QTL serem homozigotos e originários linhagem comercial and  $P(Qq|Mi)$  = probabilidade condicional dos alelos para o QTL serem heterozigotos. Valores positivos dos efeitos aditivos indicam que os alelos da raça Piau causam aumentando na característica avaliada.

O genótipo para o gene halotano foi incluído como efeito fixo, uma vez que Band et al. (2005a,b) observaram não apenas a presença da mutação Hal1843 nesta população, mas também seus efeitos ( $P < 0,05$ ) sobre características de desempenho, carcaça e qualidade de carne.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 35 marcadores microssatélites utilizados para o mapeamento dos cromossomos dos 20 animais parentais, 64 animais F1 e 600 animais F2 com seus respectivos número de alelos e conteúdo de informação polimórfica (PIC) são apresentados na Tabela 1.

A distância média entre os marcadores foi de 30 cM, explicada pela dificuldade de se identificar marcadores polimórficos em algumas regiões dos cromossomos avaliados na população estudada. Com exceção do SSC1 que foi mapeado a partir da região central do cromossomo; na maioria dos demais cromossomos, os mapas, geralmente estavam de acordo com o mapa da USDA-ARS considerado como referência (<http://www.marc.usda.gov/genome/swine/swine.html>).

Tabela 1- Identificação, posição nos cromossomos, número de alelos segregantes e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador.

Marcador	Chr <sup>1</sup>	Pos <sup>2</sup>	Alelos	PIC	Marcador	Chr <sup>1</sup>	Pos <sup>2</sup>	Alelos	PIC
SW781	1	0	3	0.436	SW1962	12	91	4	0.604
SW2035	1	29	4	0.599	S0106	12	113	7	0.812
S0113	1	54	3	0.537	SW857	14	0	7	0.780
SWR982	1	70	3	0.556	SW210	14	45	6	0.561
S0112	1	135	4	0.633	SW761	14	89	4	0.443
SW2423	2	0	6	0.794	SW2515	14	137	5	0.481
SW240	2	48	7	0.696	S0355	15	0	4	0.430
SW395	2	87	5	0.661	S0004	15	29	3	0.385
SW1883	2	110	3	0.352	SW1989	15	66	6	0.686
S0036	2	180	4	0.670	SW1316	15	88	5	0.714
SW2021	3	0	6	0.749	SW936	15	112	5	0.737
S0206	3	39	5	0.594	SW1262	15	144	3	0.514
SW902	3	67	4	0.572	SW949	X	0	6	0.6298
S0002	3	114	7	0.785	SW980	X	25	4	0.4780
SW717	3	148	4	0.634	SW2126	X	52	3	0.5233
SW2494	12	0	3	0.445	SW1943	X	111	3	0.4901
SW957	12	24	6	0.643	S0218	X	160	3	0.3759
SW168	12	61	4	0.682					

<sup>1</sup>Chr = cromossomo, <sup>2</sup>Pos = posição em cM.

Todos os marcadores utilizados neste trabalho podem ser considerados eficientes nos estudos de características quantitativas, pois a aplicabilidade dos marcadores possui relação direta com o grau de polimorfismo dos mesmos (Tabela 1). Os marcadores do presente estudo foram classificados como moderadamente polimórficos com  $0,25 < PIC < 0,5$  ou considerados altamente polimórfico, com  $PIC > 0,5$  (Botstein et al., 1980).

Os limiares de significância para testar o modelo com efeito aditivo e de dominância, obtidos via teste de permutação, em nível genômico foram de 8,30 a 10,06 respectivamente a 5% ( $P < 0,05$ ) e 1% ( $P < 0,01$ ) para os cromossomos autossômicos e de 13 e 16,35 para o cromossomo sexual. Os limiares de significância em nível cromossômico foram representados por  $P_c < 0,01$  para a 1% e  $P_c < 0,05$  para 5%.

Um total de sete QTL foram encontrados associados a diferentes características de carcaça, seis QTL para características de corte de carcaça e sete QTL para características de qualidade (Tabela 2). Desses vinte QTL, encontrou-se um para perda de cozimento (COZ) no SSC1 e um para maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar no SSC15, significativos ao nível de 5% genômico.

Tabela 2- Informações dos QTL significativos com seus efeitos aditivos (a), de dominância (d), desvio padrão (DP), variância aditiva do QTL e intervalo de confiança

Cromossomo	Características <sup>1</sup>	F	Pos <sup>2</sup>	a (DP)	d (DP)	$h^2_{q^3}$	IC <sup>4</sup>
2	PROFLOMB	7,5**	60	-1,92 (0,502)	0,30 (0,943)	8,7	20-77
2	AOL	5,8*	58	-1,20 (0,364)	0,392 (0,674)	6,36	20-79
12	SH	6,7*	92	-1,140 (0,454)	-2,023 (0,711)	2,79	89-99
14	INTEST	7,27**	107	-0,129 (0,201)	1,340 (0,359)	0,27	90-127
15	ETL	7,61**	86	0,924 (0,952)	2,004 (0,598)	1,53	81-91
15	SH	8,06***	110	0,967 (0,371)	-1,460 (0,565)	2,01	82-115
15	AOL	7,86**	123	-1,384 (0,356)	-0,271 (0,684)	8,48	105-137
2	PL	5,91*	0	-0,005 (0,011)	0,062 (0,1845)	0,06	0-22
3	PP	7,73**	42	0,071 (0,033)	-0,208 (0,059)	1,68	28-56
3	PCOPAL	5,66*	16	-0,067 (0,019)	0,009 (0,041)	6,27	0-34
14	PPL	5,34*	18	-0,132 (0,043)	-0,086 (0,071)	5,82	0-38
15	PCOPAL	6,38*	86	-0,047 (0,015)	0,040 (0,021)	3,13	71-102
15	PPAL	5,59*	86	-0,056 (0,024)	-0,088 (0,034)	1,7	77-94
1	A*	6,72*	87	-0,131 (0,083)	-0,560 (0,170)	1,62	62-107
1	COZ	8,6***	29	-0,783 (0,194)	0,210 (0,283)	5,48	16-42
1	PTOT	6,76*	29	-0,890 (0,266)	0,682 (0,391)	3,64	9-45
2	pH45	7,37**	104	-0,111 (0,29)	0,015 (0,547)	8,56	58-132
15	GOTEJ	6,67*	111	-0,446 (0,134)	-0,464 (0,212)	3,53	87-137
X	L*	10,5**	111	-0,624 (0,192)	-	5,25	100-120
X	A*	11,9**	112	0,254 (0,073)	-	6,07	97-130

\*,\*\* e \*\*\* significante a 5% e 1% nível cromossômico, e a 5% nível genômico, respectivamente;  
<sup>1</sup>PROFLOMB – profundidade de lombo (mm), AOL – área de olho de lombo, (cm<sup>2</sup>), SH – maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar (mm), INTEST – comprimento total do intestino delgado(m), ETL – menor espessura de toucinho medida na região acima da ultima vértebra lombar, na linha dorso lombar (mm), PL – peso do lombo (Kg), PP – peso do pernil (Kg), PCOPA – peso da copa (Kg), PPL – peso do pernil sem pele sem gordura (Kg), PPAL – peso da paleta sem pele sem gordura (Kg), A – índice de vermelho, COZ – perda por cozimento (%), PTOT – perda de peso total (%), GOTEJ – perda por gotejamento (%) e L – luminosidade;

<sup>2</sup>posição em cM; <sup>3</sup>fração aditiva da variância fenotípica ( $h^2_Q$ ) explicada pelo QTL ( $h^2_Q = a^2/2\sigma^2_Y$ ) em %; <sup>4</sup>intervalo de confiança em cM.

Entre as características de carcaça, os QTL para PROFLOMB (F=7,5; a= -1,92;  $P_c < 0,01$ ) e AOL (F=5,8; a= -1,20;  $P_c < 0,05$ ) foram localizados na região proximal do SSC2, indicando a existência de gene(s) que influenciam ambas as características nessa região (Figura 1) e explicaram consideravelmente a variação fenotípica da característica, 8,7% e 6,36%, respectivamente. Varona et al. (2002) encontraram QTL para profundidade de lombo na região de 54cM no SSC2. Geldermann et al. (2003) e

Lee et al. (2003) também encontraram QTL associados a lombo na região proximal do SSC2.

QTL para AOL também foi encontrado no SSC15, localizado na região distal do cromossomo (123 cM), explicando 8,48% da variação fenotípica da característica. Edwards et al. (2008 b) encontraram QTL para AOL na região proximal do SSC15 (43cM).

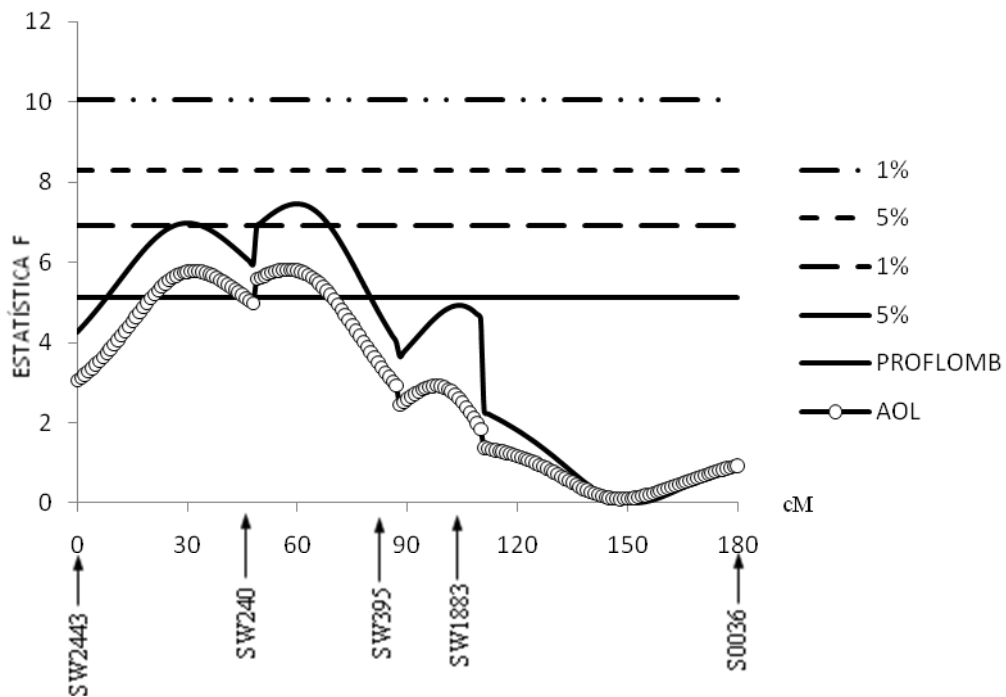


Figura 1 - Estimativas dos valores de F para profundidade de lombo (PROFLOMB) e área de olho de lombo (AOL) no SSC 2. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (- - -), 5% em nível genômico (- · -) e 1% em nível genômico (· · ·). A posição de cada marcador é indicada por setas.

Características como PROFLOMB e AOL estão relacionadas com maior percentagem de carne na carcaça e têm sido indiretamente selecionadas por meio da seleção de animais com menor percentual de gordura. Essa afirmação corrobora com os resultados observados neste estudo para essas características, que tiveram acréscimo ao seu fenótipo devido aos alelos vindo da linhagem comercial, animais que passaram por um processo de seleção para acúmulo de carne magra na carcaça.



Foram encontrados dois QTL associados a diferentes medidas de espessura de toucinho na região distal do SSC15: um QTL para ETL ( $P_c < 0,01$ ;  $a = 0,924$ ;  $h^2 = 1,53$ ); e um QTL para SH ( $P < 0,05$ ;  $a = 0,967$ ;  $h^2 = 2,01$ ) (Figura 2). Os alelos do Piau contribuíram para o aumento dessas características, uma vez que esta raça possui um alto teor de gordura na carcaça. Kuryl et al. (2003) encontraram QTL na região distal do SSC15 associados a profundidade de toucinho próximo a décima costela em famílias formadas pelo cruzamento de porco selvagem X Pietrain.

Kim et al. (2006) mostraram associação de dois marcadores na região proximal do SSC15 com espessura de toucinho: o S0355 (também usado em nosso estudo, porém não associado a um QTL) e o SW964. Geralmente, os estudos de mapeamento são feitos em populações experimentais com distintas composições genéticas, assim o alelo do(s) gene(s) associado a um QTL pode ser diferente ou alelo-QTL pode não estar em fase de desequilíbrio de ligação com os marcadores avaliados nos diferentes estudos. Sendo assim, é necessário validar os QTL em populações comerciais para serem usados na seleção assistida por marcadores (MAS).

QTL para SH ( $h^2 = 2,79$ ;  $a = -1,140$ ;  $P_c < 0,05$ ) também foi encontrado na região distal do SSC12 (92 cM), associado aos alelos da raça comercial. Ponsuksili et al. (2005) encontraram QTL para profundidade de gordura na copa na região distal do SSC12 (77cM). No SSC12, Faria et al. (2006) encontraram na mesma população utilizada nesse estudo, um polimorfismo no gene do hormônio do crescimento (G316A) associado com o número de tetas direita, peso do coração, peso do pulmão, comprimento de carcaça, peso total da paleta, peso da papada, pH medido 24 horas *post-mortem* e perda por gotejamento.

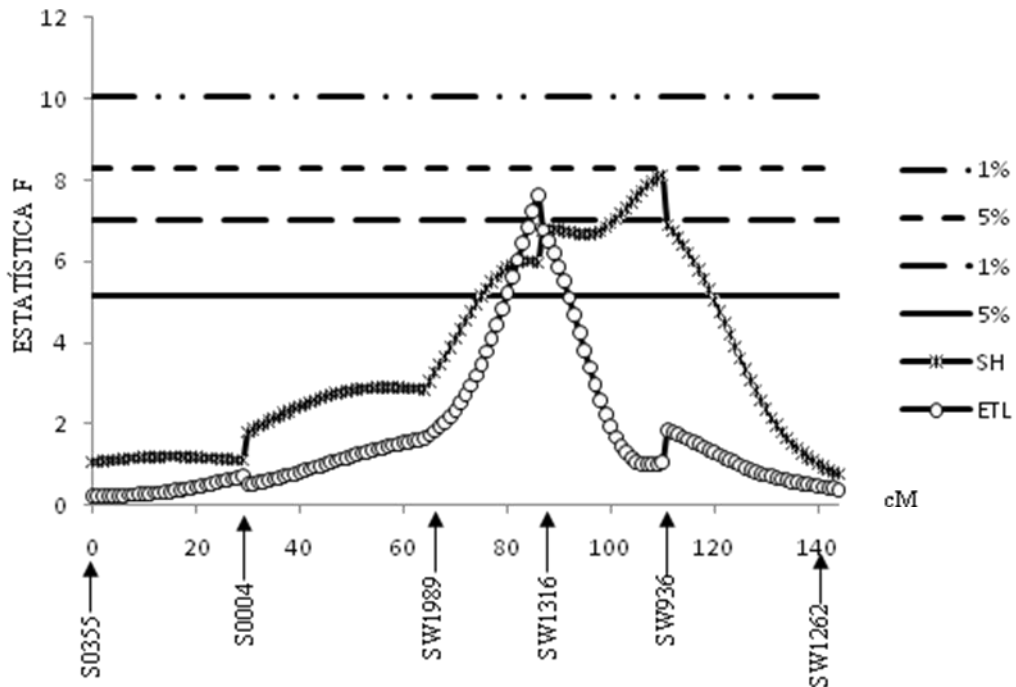


Figura 2 - Estimativas dos valores de F para maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar (SH) e menor espessura de toucinho medida na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso lombar (ETL) no SSC 15. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (- -), 5% em nível genômico (- · -) e 1% em nível genômico (- · · -). A posição de cada marcador é indicada por setas.

Um QTL para INTEST foi encontrado no SSC14 ( $h^2=0,27$ ;  $a=-0,1291$ ;  $P_c<0,01$ ). QTL para INTEST no SSC 14 também foi encontrado por Knott et al. (1998). Vários estudos mapearam QTL associados com órgãos internos, como os de Cepica et al. (2003); Geldermann et al.(2003); Jeon et.al.(1999); Lee et al. (2003); Yue et al.(2003); Beeckmann et al. (2003) e Dragos-Wendrich et al.( 2003).

Os QTL associados a características de carcaça economicamente importantes encontrados nesse estudo, como PROFLOMB e AOL são de grande interesse para investigação e uso como marcadores na indústria de suínos.

Entre as características de corte, os QTL significativos em nível de 5% cromossômico explicando 3,13% da variação fenotípica de PCOPAL ( $a=-0,047$ ) e QTL explicando 1,7% da variação fenotípica de PPAL ( $a=-0,056$ ) foram encontrados na região distal do SSC15 (86 cM), indicando que nesta região há gene ou grupo de genes que controlam estas características, corroborando esses resultados, foi encontrada uma correlação genética de 0,70 entre essas características (dados não publicados). QTL

explicando consideravelmente a variação fenotípica de PCOPAL ( $F = 5,66$ ;  $a = -0,067$ ;  $h^2_{Q^2} = 6,7$ ,  $P_c < 0,05$ ) também foi encontrado no SSC3.

Milan et al. (2002) encontraram QTL associados a alelos da raça Large White para peso do pernil nos SSC6, 8, 11 e 12. No atual estudo, foram encontrados QTL associados ao peso do pernil no SSC3 ( $F = 7,73$ ,  $h^2_{Q^2} = 1,68$ ;  $a = 0,071$ ;  $P_c < 0,01$ ) e para PPL no SSC14 ( $F = 5,34$ ,  $h^2_{Q^2} = 5,82$ ;  $a = -0,0132$ ;  $P_c < 0,05$ ). QTL para PL ( $F = 5,91$ ,  $a = -0,005$ ;  $h^2_{Q^2} = 0,06$ ;  $P_c < 0,05$ ) foi encontrado no SSC2. Com exceção do QTL para PP, todos os demais QTL para cortes de carcaça foram associados aos alelos da linhagem comercial, animais selecionados para desempenho.

Dutra Jr. et al. (2001) realizaram estudo com estimativas de rendimentos de cortes comerciais e de tecidos em suínos e concluíram que o primeiro corte em quantidade de carne na carcaça foi o pernil, com valores de 29,2 a 30,8% do total de músculo na carcaça. O corte da paleta representou de 21,2 a 23% do total de músculos na carcaça, correspondendo ao segundo corte em importância do ponto de vista industrial. Assim, a identificação de gene(s) na região dos QTL encontrados associados a essas características, pode ser de grande utilidade na seleção assistida por marcadores, uma vez que essas características de corte são de grande importância econômica.

Entre as características de qualidade de carne, no SSCX o QTL explicando consideravelmente a cor da carne,  $A^*$  ( $F = 11,9$ ,  $h^2_{Q^2} = 6,07$ ;  $a = 0,25$ ;  $P_c < 0,05$ ) foi encontrado na mesma região do QTL para  $L^*$  ( $F = 10,5$ ;  $h^2_{Q^2} = 5,25$ ;  $a = -0,624$ ;  $P_c < 0,01$ ) a 111 cM, podendo ambas as características serem controladas pelo mesmo gene (ou genes) (Figura 3). QTL para  $A^*$  também foi encontrado no SSC1 ( $F = 6,72$ ;  $h^2_{Q^2} = 1,62$ ;  $a = -0,624$ ;  $P_c < 0,05$ ).

Malek et al. (2001) encontraram alelos da raça suína Berkshire associados ao menor escore de refletância nos SSC14, 15 e 17, mas com maior refletância nos SSC 2, 4, 5, 7 e 18. No presente estudo, observou-se que os alelos da raça Piau estavam associados favoravelmente a característica  $A^*$  no SSCX e não associados a ao QTL para  $A^*$  no SSC1.

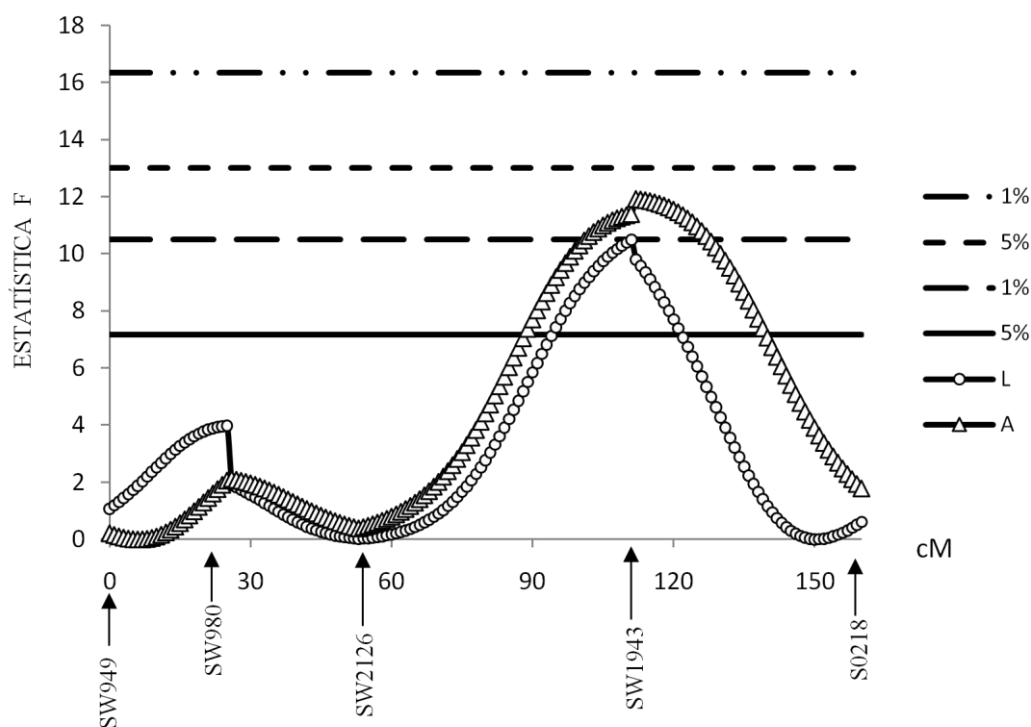


Figura 3 - Estimativas dos valores de F para índice de vermelho (A\*) e luminosidade (L\*) no SSC X. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (- -), 5% em nível genômico (- - -) e 1% em nível genômico (- · -). A posição dos marcadores é indicada por setas.

Na região distal do SSC2 (104 cM) encontrou-se um QTL para pH45 que explica consideravelmente a variação fenotípica da característica ( $F=7,37$ ;  $h^2 = 8,56$ ;  $a=-0,11$ ;  $P_c < 0,01$ ), associado aos alelos da Linhagem comercial. Lee et al. (2003), encontraram QTL para pH 24 na região distal do SSC2 (73 cM).

Na população em estudo, encontrou-se correlações genéticas entre pH45 e  $L^*$ ,  $B^*$ , COZ e PTOT de -0,47, -0,6, -0,62, -0,74 e -0,5, respectivamente (dados não publicados). Assim, a descoberta de QTL associados a qualquer uma dessas características correlacionadas é de grande interesse para estudo, validação e uso em programas de seleção.

A capacidade de retenção de água da carne é um aspecto importante tanto para os consumidores quanto para a indústria. Segundo Jensen et al.(1998), a perda de exsudado é um dos principais fatores na diminuição da qualidade de produtos cárneos nas indústrias, e ocorre pelo encolhimento *pos-mortem* das miofibrilas, devido a diminuição do pH.

No SSC15, encontrou-se um QTL para GOTEJ ( $F=6,67$ ;  $h^2=3,53$ ;  $a=-0,04$ ;  $P_c<0,05$ ) localizado na região distal do cromossomo (111 cM). Edwards et al. (2008b) também encontraram QTL para perda por gotejamento na região distal do SSC15 (75cM).

Dois QTL associados a perda de água foram encontrados no SSC1, QTL para COZ e PTOT, localizando-se na região proximal do cromossomo (Figura 4). Nesta população observou-se também a moderada correlação genética entre GOTEJ e COZ de 0,64; e GOTEJ e PTOT de 0,83 (dados não publicados). Malek et al. (2001) encontraram QTL para GOTEJ na região distal do SSC 1 (90cM) para uma população formada por Berkshire X Yorkshire.

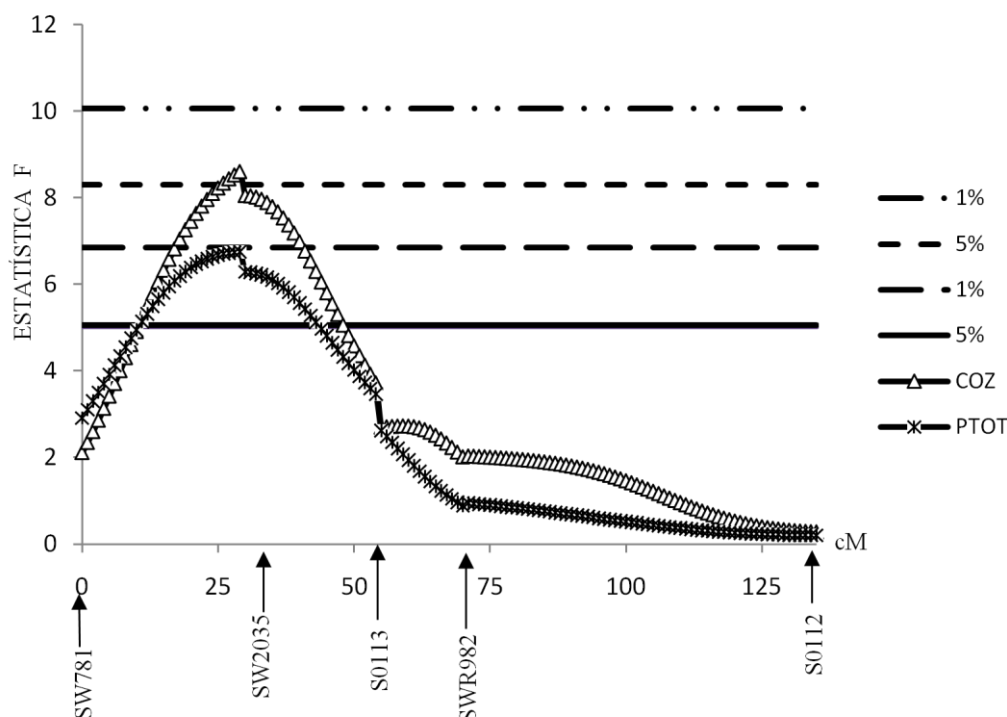


Figura 4 - Estimativas dos valores de F para perda ao cozimento (COZ) e perda de peso total (PTOT) no SSC 1. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (- -), 5% em nível genômico (- · -) e 1% em nível genômico (- · · -). A posição dos marcadores é indicada por setas.

Dada a importância da retenção de água na carne, o QTL encontrado para COZ significativo a 5% em nível genômico, correlacionado positivamente com a característica GOTEJ, explicando consideravelmente a variação fenotípica dessa

característica (5,48%), torna-se um importante alvo para investigação de genes que possam ser validados em populações comerciais e utilizados na MAS.

A intensa seleção para reduzir a espessura de toucinho e aumentar o rendimento de carne magra reduziu o teor de gordura intramuscular (IMF) levando a redução da qualidade da carne suína. Apesar de não ter sido encontrado QTL para gordura intramuscular na população F2 abatida aos 65 kg, a análise de variância nos grupos genéticos Piau, linhagem Comercial e animais F1 abatidos aos 120 Kg apresentaram diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para o conteúdo de gordura intramuscular quando comparou Piau e cruzados com os animais da linhagem comercial, indicando que alelos provenientes de animais Piau têm papel importante na deposição de gordura intramuscular (Serão et al, 2010).

Assim, a utilização da raça Piau em cruzamentos comerciais para melhoria da qualidade da carne suína poderia ser uma realidade. Segundo Brewer et al. (2001), o teor de gordura intramuscular em *Longissimus dorsi* em suínos é correlacionado com propriedades sensoriais da carne. Além do mais, a variabilidade genética encontrada em raças nativas ou naturalizadas tem um importante papel em programas de melhoramento a ser explorada. Sollero et al. (2008), estimaram a diversidade genética dentro e entre cinco grupos genéticos de suínos ( $n = 182$ ): três raças naturalizadas (Moura, Piau e Monteiro), uma raça comercial (Landrace) e um composto comercial (MS60), com 28 marcadores microsatélites e mostraram que 14% da variação total observada ( $P < 0,001$ ) foi devido às diferenças entre as raças.

O intervalo de confiança (IC95%) para os QTL significativos em nível de 5% genômico, SH no SSC 15 e COZ no SSC1, apresentaram-se amplos, 82-115 cM (Tabela 2 e Figura 2) e 16-42 cM (Tabela 2 e Figura 4), respectivamente. Amplos intervalos de confiança são gerados devido à presença de dois QTL e não apenas de um e/ou devido à grande distância entre os marcadores, o que aconteceu no presente estudo.

O IC95% também foi calculado para os QTL em nível cromossômico e mostraram-se amplos (Tabela 2). Segundo Edwards et al. (2008b), o intervalo de confiança não deveria ser calculado para QTL significantes em nível cromossômico, pois análises preliminares indicaram que muitos desses intervalos tendem a abranger todo o cromossomo.

## CONCLUSÕES

QTLs associados a importantes características econômicas, com efeitos aditivos significativos e  $h^2$  expressivas foram encontrados na população F2 gerada pelo cruzamento entre suínos machos da raça naturalizada Piau e fêmeas comerciais.

QTL com curvas F pouco definidas poderão ser melhor delimitados com a inclusão de mais marcadores. As informações dos QTL significativos detectados neste estudo serão úteis para estudos de mapeamento fino e identificação de genes para a prática da MAS, portanto, a eficiência dos programas de melhoramento, principalmente, para características de qualidade de carne; que são características de baixa herdabilidade e medidas após o abate.

Além disto, novos conhecimentos sobre o desenvolvimento da fisiologia das características produtivas poderão trazer benefícios a produção animal. Encontrando-se nas raças naturalizadas um campo de variabilidade a ser explorado nos programas de melhoramento.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Max F. Rothschild, coordinator do US Pig Genome Project, pela doação dos primers microssátelites.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H. et al. Genetic mapping of quantitative traitloci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.263, p.1771-1774, 1994.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genet. and Molecular Biology**, v.8, n.1, p.88-91, 2005a.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress Syndrome gene and carcass and performance trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genet. and Molecular Biology**, v.8, n.1, p.92-96, 2005b.

- BEECKMANN, P.; SCHRÖFFEL JR, J.; MOSER, G. et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* Chromosome 3. **Journal Animal Breeding Genetics**, .v.120, p.20–27, 2003.
- BENEVENUTO JÚNIOR. A.A. **Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais. de raça nativa e cruzados**. 2001. 93p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BIDANEL, J.P.; MILAN, D.; IANNUCELLI, N. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Genetics. Selection Evolution**, v.33, p.289–309, 2001.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BREWER, M.S.; ZHU, L. G.; MCKEITH, F. K. Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. **Meat Science**, V.59, P.153–163, 2001.
- CEPICA, S.; STRATIL, A.; KOPECNY, M.; et al. 2003. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 4. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, p.28–37.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v138, p.963-971, 1994.
- DRAGOS-WENDRICH, M.; MOSER, G.; BARTENSCHLAGER, H. et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 10. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, n.1, p.82–88, 2003.
- DUTRA, J.R., W.M.; FERREIRA, A.S.; TAROUÇO, J.U. et al. Estimativas de Rendimentos de Cortes Comerciais e de Tecidos de Suínos em Diferentes Pesos de Abate pela Técnica de Ultra-sonografia em Tempo Real. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.30, n.4, p.1243-1250, 2001.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.634-640, 2006.
- EDWARDS, D.B.; ERNST, C.W.; TEMPELMAN, R.J. et al. Quantitative trait loci mapping in an F2 Duroc x Pietrain resource population: I.Growth traits. **Journal Animal Science**, v.86, p.241-253, 2008a.
- EDWARDS, D.B.; ERNST, C. W., RANEY, N. E. et al. Quantitative trait locus mapping in an F2 Duroc x Pietrain resource population: II.Carcass and meat quality traits. **Journal Animal Science**, v.86, p.254-266, 2008b.
- GELDERMANN, H.; MÜLLER, E.; MOSER, G. et al. Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, p.363–393, 2003.
- GREEN. P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **Documentation for CRIMAP**. St. Louis: Washington University School of Medicine, 1990.
- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, v.15, n.3, p.27-28, 2001.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S. A.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, 136:1195–1207, 1994.
- JEON, J. T.; CARLBORG, O.; TORNSTEN, A. et al. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. **Nature Genetics**, 21: 157–158, 1999.
- JENSEN, C.; LAURIDSEN, C., BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.62–72, 1998.



- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1006, 2007.
- KARLSKOV-MORTENSEN, P.; BRUUN, C.S.; BRAUNSCHEWIG, M.H. et al. Genome-wide identification of quantitative trait loci in a cross between Hampshire and Landrace I: carcass traits. **Animal Genetics**, v.37, n.2, p.156–162, 2005
- KIM, C.W.; HONG, Y.H.; YUN, S.I. et al. Use of Microsatellite Markers to Detect Quantitative Trait Loci in Yorkshire Pigs. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.2, p.229-237, 2006.
- KNOTT, S.A.L.; MARKLUND, C.S.; HALEY, K. et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. **Genetics**, v.149, p.1069- 1080, 1998.
- KURYL, J.; PIERZCHALA, M.; HOJNY, J. et al. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 15. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, n.1, p.119–125, 2003.
- LEE, S.S., CHEN, Y.; MORAN, C. et al. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 2. **Journal Animal Breeding Genetics**, 120 (1):11–19, 2003.
- MALEK, M.; DEKKERS, J. C. M.; LEE, H. K. et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. **Mammalian Genome**, v.12, p.637–645, 2001.
- MILAN, D.; BIDANEL, J. P.; IANNUCELLI, N. et al. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. **Genetics Selection Evolution**, v.34, n.6, p.705-28, 2002.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- PAIXÃO, D.M., SILVA FILHO, M.I., PEREIRA, M.S. et al. Quantitative trait loci for carcass, internal organ and meat quality traits on porcine chromosomes 16, 17 and 18. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.898-901, 2008a.
- PAIXÃO, D.M., GUIMARÃES, S.E.F., SILVA FILHO, M.I. et al. Detecção de locos de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 and 18 de suínos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.10, p.1781-1787, 2008b
- PEIXOTO, J.O.; FARIA, D.A., SILVA, P.V. et al. Association between leptin gene single nucleotide polymorphisms and carcass traits in pigs **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38,n.2, p.271-276, 2009.
- PÉREZ-ENCISO, M.; CLOP, A.; NOGUERA, J. L. et al. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from Iberian by landrace intercross. **Journal Animal Science**, v.78, p.2525-2531, 2000.
- PIRES, A.V.; LOPES, P.S., GUIMARÃES, S.E.F. et al. Quantitative trait loci mapping for meat quality traits in swine chromosome 6. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5; p608-615, 2005.
- PONSUKSILI, S.; CHOMDEJ, S.; MURANI, E. et al. SNP detection and genetic mapping of porcine genes encoding enzymes in hepatic metabolic pathways and evaluation of linkage with carcass traits. **Animal Genetics**, 36:477–483, 2005.
- SATO, S.; OYAMADA, Y.; ATSUJI, K. et al. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan × Duroc F2 resource population. **Journal Animal Science**, v.81, p.2938–2949, 2003.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. **SAS/STAT® user's guide**: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.

- SEATON, G.; HERNANDEZ J.; GRUNCHEC J.A. et al. GridQTL: a Grid Portal for QTL mapping of compute intensive datasets. In: 8TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION. Belo Horizonte, Brazil, 2006. P.13-18.
- SERÃO, N., RIBEIRO, A., VERARDO, L., BRACCINI, J.N., GASPARINO, E., CAMPOS, C., LOPES, P., GUIMARÃES, S. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *Animal Breeding and Genetics*, JABG-09-0151.R2, 2010. (aprovado).
- SILVA, K.M.; PAIXÃO, D.M.; SILVA, P.V. et al. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p.475-480, 2008.
- SOLLERO, B.P.; PAIVA, S.R.; FARIA, D.A. et al. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v.123,n.1, 2009.
- TERRA, N.N.; FRIES, L.L.M. A qualidade da carne suína e sua industrialização. IN: CONFERÊNCIA VIRTUAL INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2000.
- VARONA, L.; OVILO, C.; CLOP, A. et al. ARRAGAN, C., TORO, M.A., BABOT, D., SANCHEZ, A. QTL mapping for growth and traits in a Iberian by landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. **Genetics Research**, v.80, p.145-154, 2002.
- YUE, G.; STRATIL, A.; CEPICA, S. et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 7. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, n.1, p.56-65, 2003.

## CAPÍTULO II

### **Deteção de Locos de Características Quantitativas nos cromossomos 1,2,3,12,14,15 e X de Suínos: características de desempenho**

**RESUMO** - A realização do presente estudo teve como objetivo mapear QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados com características de desempenho nos cromossomos 1,2,3,12,14,15 e X em uma população F2 de suínos desenvolvida pelo cruzamento de dois machos da raça brasileira Piau com 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain). O mapa de ligação para essa população foi construído após a genotipagem dos animais para 35 marcadores microssatélites, e os genótipos foram analisados. As estimativas do conteúdo de informação polimórfica (PIC) indicaram que os marcadores microssatélites foram adequados para as análises de QTL. Os dados foram analisados pelo mapeamento por intervalo usando o programa GridQTL. Um total de oito QTL foram encontrados, destes o QTL para idade de abate foi significativo em nível de 5% genômico. As informações dos QTL significativos detectados neste estudo serão úteis para estudos futuros de mapeamento fino para a identificação de genes que poderão ser usados em conjunto com os métodos tradicionais, na seleção assistida por marcadores, ou mesmo para a melhor compreensão dos fenótipos produtivos de suínos.

Palavras-chaves: genômico, raça Piau, marcador

## **Detection of quantitative trait loci on chromosomes 1, 2, 3,12 ,14 ,15 and X in pigs: performance characteristics**

**ABSTRACT** - The accomplishment of the present study had as objective to map Quantitative Trait Loci (QTL) related to performance traits in a F2 pig population developed by mating two Brazilian Piau breed sires with 18 dams from a commercial line (Landrace × Large White × Pietrain). The linkage map for this population was constructed after genotyping the animals for 35 microsatellite markers. Estimates of polymorphic information content (PIC) indicated that the microsatellite markers were appropriate for QTL analyses. The genotypes were analyzed by interval mapping using the GridQTL program. A total of 8 QTL were found, from these, the QTL for slaughter age (days) was significant at the 5% genome-wise level. The information of the significant QTL detected in this study is useful for future fine-mapping studies for identification of genes. Such information can be used together with traditional methods in marker-assisted selection, to improve the efficiency of breeding programs.

Key words: genome-wise, Piau breed, marker

## INTRODUÇÃO

As características de crescimento, consumo alimentar e conversão alimentar têm grande importância para a indústria de suínos, contudo, a arquitetura genética associada a essas características é ainda pouco conhecida.

Selecionar reprodutores para formar um sistema eficiente de produção na suinocultura é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento e a identificação de genes influenciando características economicamente importantes seguida pela seleção assistida por marcadores (MAS), pode resultar em uma maior resposta à seleção desses reprodutores.

O uso de marcadores moleculares é uma tecnologia com muitas aplicações e, a localização de QTL é uma delas. Em suínos, um grande número de QTL (associações estatísticas significativas entre os valores genotípicos e a variabilidade fenotípica na progênie segregante), têm sido identificados usando intercruzamento entre populações divergentes (Andersson et al. 1994; Knott et al. 1998; De Koning et al., 1999; Pérez-Enciso et al., 2000; Bidanel et al., 2001; Malek et al. 2001; Geldermann et l., 2003; Pires et al., 2005; Silva et al., 2008; Paixão et al., 2008a,b, Duthie et al., 2008; Ding et al., 2009; Gilberts et al., 2010).

A raça naturalizada brasileira Piau, utilizada neste experimento como a raça segregante, cujo nome na língua indígena, significa “pintado” (Tôrres, 1968), foi originada dos primeiros suínos trazidos pelos colonizadores portugueses e pertenciam às raças da península Ibérica. Segundo Guimarães & Lopes (2001), as características principais destes animais são a rusticidade, a adaptabilidade as condições precárias de manejo e alimentação e a grande resistência a doenças. Além disso, a raça é caracterizada por baixa produção, tamanho pequeno da leitegada e grande acúmulo de gordura subcutânea.

O presente trabalho foi realizado com objetivo de fazer a varredura genômica nos cromossomos de suínos SSC1, SSC2, SSC3, SSC12, SSC14, SSC15 e SSCX, por meio de marcadores microssatélites, para detecção de QTL influenciando características de crescimento, conversão alimentar e número de tetas em uma população F<sub>2</sub> formada a partir do cruzamento de suínos da raça Piau com uma linhagem comercial.

## MATERIAL E MÉTODOS

Uma população experimental composta por três gerações foi desenvolvida na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da UFV, em Viçosa, MG, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001.

Os animais F2 foram originados a partir do cruzamento de dois varrões da raça naturalizada brasileira Piau com 18 fêmeas de uma linhagem comercial (Landrace × Large White × Piétrain) selecionada para características de desempenho. Na geração F1, 11 machos e 54 fêmeas, não aparentados, foram acasalados ao acaso.

Os animais foram pesados ao nascimento e desmamados aos 21 dias de idade. Após o desmame, todos os animais receberam ração comercial à vontade. Dos 77 aos 105 dias de idade, os animais foram mantidos em baias individuais e o consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e o ganho de peso diário (GPD) foram medidos.

Os animais foram abatidos no momento que atingiram aproximadamente 65 kg ( $64,9 \pm 6,0$ ) com  $148,2 \pm 10,5$  dias de idade. Foram avaliadas 12 características de desempenho, cuja estatística descritiva (SAS, 2000) é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Características de desempenho avaliadas, descrição das características (unidade), número de observações (N), média, desvio padrão (DP) e a covariável utilizada no modelo estatístico.

Característica	Descrição (unidade)	N	Média	DP	Covariável <sup>1</sup>
PN	Peso ao nascer (kg)	415	1,20	0,27	TLN
P21	Peso aos 21 dias de idade (kg)	412	4,91	1,06	TLD
P42	Peso aos 42 dias (kg)	413	8,32	1,85	TLD
P63	Peso aos 63 dias (kg)	422	16,24	3,40	TLD
P77	Peso aos 77 dias (kg)	427	21,38	4,33	TLD
P105	Peso aos 105 dias (kg)	420	36,23	6,59	TLD
PA	Peso ao abate (kg)	417	64,91	6,04	TLD
IDA	Idade ao abate (dia)	424	148,20	10,5	TLD
CR	Consumo de ração (Kg)	425	40,16	8,35	P77
GPD	Ganho de peso diário (kg/dia)	415	0,53	0,13	P77
CA	Conversão alimentar (Kg/Kg)	408	2,76	0,58	P77
NT	Número de tetas	426	13,10	1,27	

<sup>1</sup> TLN = tamanho da leitegada ao nascimento; TLD = tamanho da leitegada ao desmame; P77= peso aos 77 dias

O DNA dos 20 animais parentais, 64 F1 e 600 F2 foi extraído de sangue coletado imediatamente após o abate utilizando-se o método de extração por precipitação com sal (Miller et al., 1988). As soluções de DNA para uso foram diluídas na concentração de 25 ng / $\mu$ L em solução de Tris\_EDTA (Tris-HCL 10 mM- pH 8,0 e EDTA 1 mM- pH 8,0 ) e foram mantidas em geladeira a 4°C. A subsequente análise do DNA genômico

foi feita no Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Os *primers* de microssátelites foram doados pelo coordenador do *US Pig Genome* (*supported by the USDA-Cooperative State Research, Education, and Extension Service through National Research Support*). O conjunto inicial dos marcadores microssátelites foi testado em relação a sua amplificação e informatividade e assim 35 marcadores foram selecionados para mapear o genoma dos animais.

As amplificações de 684 animais foram feitas em termocicladores MJ Research PTC 100-96, utilizando QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen, Valencia, C.A., EUA). O scoreamento dos fragmentos amplificados foi feito utilizando-se o software GenScan (Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA) por meio de sequenciador automático ABI PRISM 3700.

A determinação da informação contida em cada loco bem como o grau de polimorfismo dos mesmos (PIC) foi computada por meio do software CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Para construção do mapa de ligação dos seis cromossomos autossômicos e o cromossomo sexual X utilizou-se o software CRIMAP versão 2.4 (Green et al., 1990).

Os dados de genótipos, fenótipos e o mapa de ligação gerados foram submetidos ao software GridQTL (Seaton et al., 2006) para detecção de QTL. No modelo estatístico utilizado, assumiu-se que o QTL é dialélico e com alelos alternativos fixados em cada raça parental. A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada conforme o genótipo dos marcadores, a intervalos de 1 cM ao longo do cromossomo. Essas probabilidades são usadas para se fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL em estudo, para cada animal, como descrito por Haley et al. (1994).

A determinação dos limiares de significância cromossômica ( $P_c < 0,05$  e  $P_c < 0,01$ ) foi feita no software GRIQTL, com 10.000 permutações (Churchill & Doerge, 1994). Os limiares genômicos foram obtidos por meio da correção de Bonferroni (Knott et al., 1998). O intervalo de confiança a 95% (CI95%) para a localização do QTL foi obtido usando a aproximação de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). A fração aditiva da variância fenotípica ( $h_o^2$ ) explicada por determinado QTL foi computada conforme descrito por Pérez-Enciso et al. (2000). O seguinte modelo estatístico foi ajustado aos dados:

$$y_{ijkl} = S_i + L_j + H_k + (C_{ijkl} - \bar{C})b + c_a a + c_d d + e_{ijkl},$$

em que  $y_{ijkl}$  é o fenótipo do suíno  $l$  do sexo  $i$  com genótipo  $k$  pertencente ao lote de nascimento  $j$ ;  $S_i$  é o efeito fixo de sexo  $i$ ,  $i = 1$  (macho), 2 (fêmea);  $L_j$  é o efeito fixo de lote  $j$ ,  $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ;  $H_k$  é o efeito fixo do genótipo do halotano  $k$ ,  $k = 1$  (NN), 2 (Nn, portador);  $(C_{ijkl} - \bar{C})b$  é ajustamento para as covariáveis (TLN, TLD e P77);  $e_{ijkl}$  é resíduo.

O valor  $c_a$  é função das probabilidades condicionais do QTL, dado o genótipo dos marcadores, e é calculado da seguinte forma:

$$c_a = P(QQ|Mi) - P(qq|Mi)$$

$$c_d = P(Qq|Mi)$$

Onde  $P(QQ/Mi)$  = probabilidade condicional dos alelos para o QTL serem homozigotos e originários da raça naturalizada Piau;  $P(qq|Mi)$  = probabilidade condicional dos alelos para o QTL serem homozigotos e originários linhagem comercial e  $P(Qq|Mi)$  = probabilidade condicional dos alelos para o QTL serem heterozigotos. Valores positivos dos efeitos aditivos indicam que os alelos da raça Piau causam aumento na característica avaliada.

O genótipo para o gene Halotano foi incluído como efeito fixo, uma vez que Band et al. (2005a,b) observaram não apenas a presença da mutação Hal1843 nesta população, mas também seus efeitos ( $P < 0,05$ ) sobre características de desempenho, carcaça e qualidade de carne.



## RESULTADOS

Todos os 35 marcadores utilizados no presente trabalho são considerados eficientes para estudos de características quantitativas, uma vez que a aplicabilidade dos marcadores em estudos de mapeamento possui relação direta com o grau de polimorfismo dos mesmos. E estes foram classificados como moderadamente polimórficos ( $0,25 > PIC > 0,5$ ) ou considerados altamente polimórficos ( $PIC > 0,5$ ) (Botstein et al., 1980).

Tabela 2. Posição dos marcadores no cromossomo, número de alelos segregando para cada marcador (Alelos) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador.

Marcadores	SSC <sup>1</sup>	Pos <sup>2</sup>	Alelos	PIC	Marcadores	SSC <sup>1</sup>	Pos <sup>2</sup>	Alelos	PIC
SW781	1	0	3	0,436	SW1962	12	91	4	0,604
SW2035	1	29	4	0,599	S0106	12	113	7	0,812
S0113	1	54	3	0,537	SW857	14	0	7	0,780
SWR982	1	70	3	0,556	SW210	14	45	6	0,561
S0112	1	135	4	0,633	SW761	14	89	4	0,443
SW2423	2	0	6	0,794	SW2515	14	137	5	0,481
SW240	2	48	7	0,696	S0355	15	0	4	0,430
SW395	2	87	5	0,661	S0004	15	29	3	0,385
SW1883	2	110	3	0,352	SW1989	15	66	6	0,686
S0036	2	180	4	0,670	SW1316	15	88	5	0,714
SW2021	3	0	6	0,749	SW936	15	112	5	0,737
S0206	3	39	5	0,594	SW1262	15	144	3	0,514
SW902	3	67	4	0,572	SW949	X	0	6	0,6298
S0002	3	114	7	0,785	SW980	X	25	4	0,4780
SW717	3	148	4	0,634	SW2126	X	52	3	0,5233
SW2494	12	0	3	0,445	SW1943	X	111	3	0,4901
SW957	12	24	6	0,643	S0218	X	160	3	0,3759
SW168	12	61	4	0,682					

<sup>1</sup>SSC –*sus scrofa chromosome*

<sup>2</sup>Posição dos marcadores no cromossomo em cM.

A distância média entre os marcadores em algumas regiões dos cromossomos avaliados foi ampla, devido à dificuldade de se identificar marcadores polimórficos nestas regiões na população de estudo. Na maioria dos cromossomos os mapas de ligação estavam de acordo com o tamanho do mapa do USDA-ARS, considerado como referência (<http://www.marc.usda.gov/genome/swine/swine.html>).

Foram identificados oito QTL associados a diferentes características de desempenho (Tabela 3). Destes oito QTL, encontrou-se somente um QTL significativo em nível genômico no SSC3. Os limiares de significância para testar o modelo com

efeito aditivo e de dominância, obtidos via teste de permutação em nível genômico foram de 8,30 a 10,06, respectivamente a 5% e 1% para os cromossomos autossômicos e de 13 e 16,35 para o cromossomo sexual.

Tabela 3- Estimativas da posição (POS), valores de F significativos (F), efeito aditivo (a) de dominância (d), desvio padrão (DP), variância aditiva dos QTL e intervalo de confiança (IC).

SSC	<sup>1</sup> Características	F	<sup>2</sup> POS	a (DP)	d (DP)	<sup>3</sup> $h_q^2$ (%)	<sup>4</sup> IC
1	CR	6,21*	109	1,89 (0,94)	-7,48(2,35)	3,70	81-133
1	GPD	5,57*	91	0,04 (0,01)	-0,07 (0,03)	6,40	64-114
1	P63	5,55*	71	0,81 (0,29)	-0,62(0,46)	3,95	70-92
1	P105	6,96**	71	1,94 (0,54)	0,11 (0,87)	5,1	70-95
1	IDA	5,14*	24	-0,39(0,89)	4,62(1,44)	0,08	11-37
3	IDA	9,03***	14	4,10(1,00)	-2,73(2,04)	8,80	0-26
15	CR	5,45*	64	-0,30(0,54)	2,52(0,77)	0,10	50-73
X	NT	6,83*	112	0,38(0,15)	0,80(0,31)	4,59	103-131

\*, \*\*, \*\*\*significante a at 5% ( $P_c < 0,05$ ), 1% ( $P_c < 0,01$ ) nível cromossômico, 5% nível genômico ( $P < 0,05$ ), respectivamente, <sup>1</sup>CR – consumo de ração dos 77 aos 105 dias de idade (kg); GPD – ganho de peso diário (kg); P63 – peso aos 63 dias de idade(kg); P105 – peso aos 105 dias de idade (Kg), IDA – idade ao abate (dias) e NT – número de tetos.; <sup>2</sup> posição; <sup>3</sup> A fração aditiva da variância fenotípica ( $\sigma_y^2$ ) explicada pelo QTL ( $h_Q^2 = a^2/2 \sigma_y^2$ ), <sup>4</sup> intervalo de confiança em cM.

A deposição de gordura requer mais energia e nutrientes do que a deposição de proteína, assim, alelos associados a um maior consumo de alimentos podem estar diretamente relacionadas a uma maior deposição de gordura. QTL para CR (a=1,), GPD (a=0,04), P63 (a=0,81) e P105 (a=1,94) foram encontrados na região distal do SSC1 e o aumento nestas características foi associado à presença de alelos vindos da raça Piau, animais caracterizados por uma baixa produção e grande acúmulo de gordura subcutânea. Ainda no SSC1 encontrou-se um QTL para IDA; contudo, associado aos alelos vindos da linhagem comercial (a=-0,039), corroborando com esses resultados encontrou-se nessa população valores de correlação genética positiva entre as características de pesos nas várias idades, correlações genéticas positivas do CR e as características GPD (0,74), PA (0,54); e correlações negativas do CR e as características IDA (-0,44) e CA (-0,39) (dados não publicados).

Os QTL para P63 e P105 foram encontrados na mesma região do SSC1 (71 cM) e próximos dos QTL para CR (109 cM) e GPD (91 cM), indicando a possibilidade de que nesta região, o mesmo gene (ou genes) esteja (m) controlando essas características

(Figura 1). QTL para GPD em nível genômico associado aos alelos vindo da raça Duroc foi encontrado na região distal (93,2 cM) do SSC1 por Liu et al. 2007. QTL afetando GPD na região distal do SSC1 também foram encontrados por Paszek et al. (1999); Rohrer (2000), Bidanel et al. (2001) e Sanchez et al. (2006).

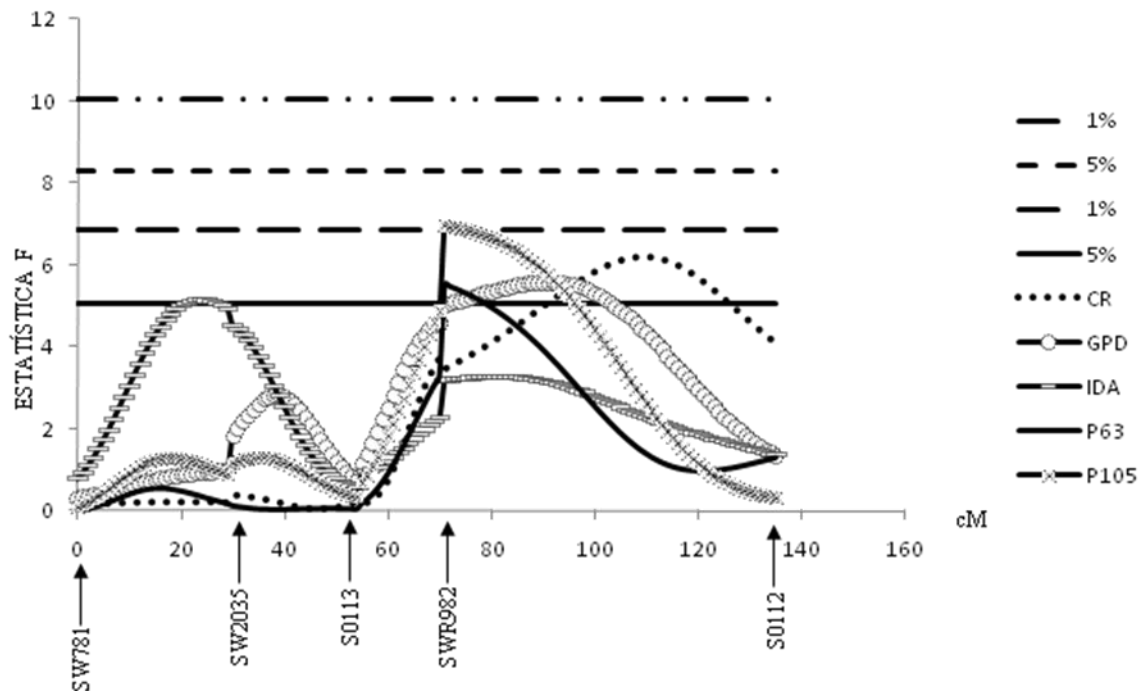


Figura 1 - Estimativas dos valores de F para consumo de ração (CR) e ganho de peso médio diário (GPD), idade de abate (IDA), peso aos 63 dias de idade (P63) e peso aos 105 dias de idade (P105) no SSC 1. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (- - -), 5% em nível genômico (- · -) e 1% em nível genômico (- · · -). A posição dos marcadores é indicada por setas.

O melhoramento genético baseia-se na variabilidade existente entre os animais. Segundo Cheng *et al.* (2000), estudos sobre polimorfismos de nucleotídeos (SNP) têm grande potencial para melhorar as características de desempenho como massa muscular, conversão alimentar e ganho diário. Entre os genes candidatos envolvidos na regulação do balanço energético, encontra-se o Receptor 4 da Melanocortina (MC4R) localizado no SSC1q22–q27 (cerca de 94,3 cM), na região distal do cromossomo ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome)); região onde se localizou os QTL associados CR, GPD, P63, P105 no presente estudo.

De acordo com os resultados de Kim et al. (2000), o MC4R exerce influência nas características de desempenho em suínos, particularmente na espessura de toucinho, na

taxa de crescimento e no consumo alimentar. Encontra-se também como genes candidatos a influenciar características de importância econômica em suínos e localizado no SSC 2 , o gene do IGF2 (*Insulin-like growth factor 2*), influenciando a porcentagem de carne magra e espessura de gordura dorsal (Nezer et al.,1999). No estudo aqui apresentado, não encontrou-se QTL no SSC2. Outros estudos encontraram QTL associados a consumo de ração na região proximal do SSC2, onde se encontra o gene do IGF2 (Van Laere et al., 2003; Houston et al., 2005). QTL para CA dos 90 aos 120 Kg foi mapeado no SSC2 por Duthie et al. (2008), em uma população formada pelo cruzamento de machos Piétrain e fêmeas mestiças (Large white X Landrace X Leicoma).

Os QTL para CR ( $P_c < 0,05$ ), GPD ( $P_c < 0,05$ ), P63 ( $P_c < 0,05$ ) e P105 ( $P_c < 0,01$ ), explicaram consideravelmente a variância fenotípica da característica (respectivamente, 3,7%, 6,39%, 3,05% e 5,1%). Bidanel et al. (2001), encontraram QTL no SSC1 explicando de 1 a 3% da variância fenotípica do peso corporal de 10 a 17 semanas de idade associados aos alelos vindo da raça Meishan. Quintanilla et al. (2002) encontraram 4 QTL na região distal do SSC1 associados a características de desempenho: peso aos 10, aos 13 e 17 dias e GPD em uma população formada pela cruzamento de Large White e Meishan.

Gilbert et al. (2010), em uma população formada pelo retrocruzamento de animais Piétrain e Large White, encontraram QTL para CR no SSC2; CA e consumo de ração diária no SSC15; além de QTL para peso aos 70 dias no SSC1; peso aos 28 dias no SSC12; e peso ao nascimento, peso aos 28 e 70 dias no SSC14.

Na região central do SSC15 encontrou-se um QTL para CR significativo a 5% em nível cromossômico, explicando apenas 0,01% da variação fenotípica dessa característica e associado aos alelos vindos da linhagem comercial . QTL associado a consumo de ração no SSC15 foram encontrados por Liu et al. (2007) e Houston et al. (2005).

QTL significativo a 5% genômico para IDA foi encontrado na região proximal do SSC3, explicando consideravelmente a variação dessa característica (8,80%) associado aos alelos vindos da raça Piau, conhecida como suínos tipo banha (Figura 2). Este achado faz sentido, pois os animais Piau levam mais dias para atingir a idade de abate. Na região proximal do SSC3 foram encontrados QTL para peso ao nascimento por Liu et al (2007), Quintanilla et al. (2002) e Malek et al. (2001).

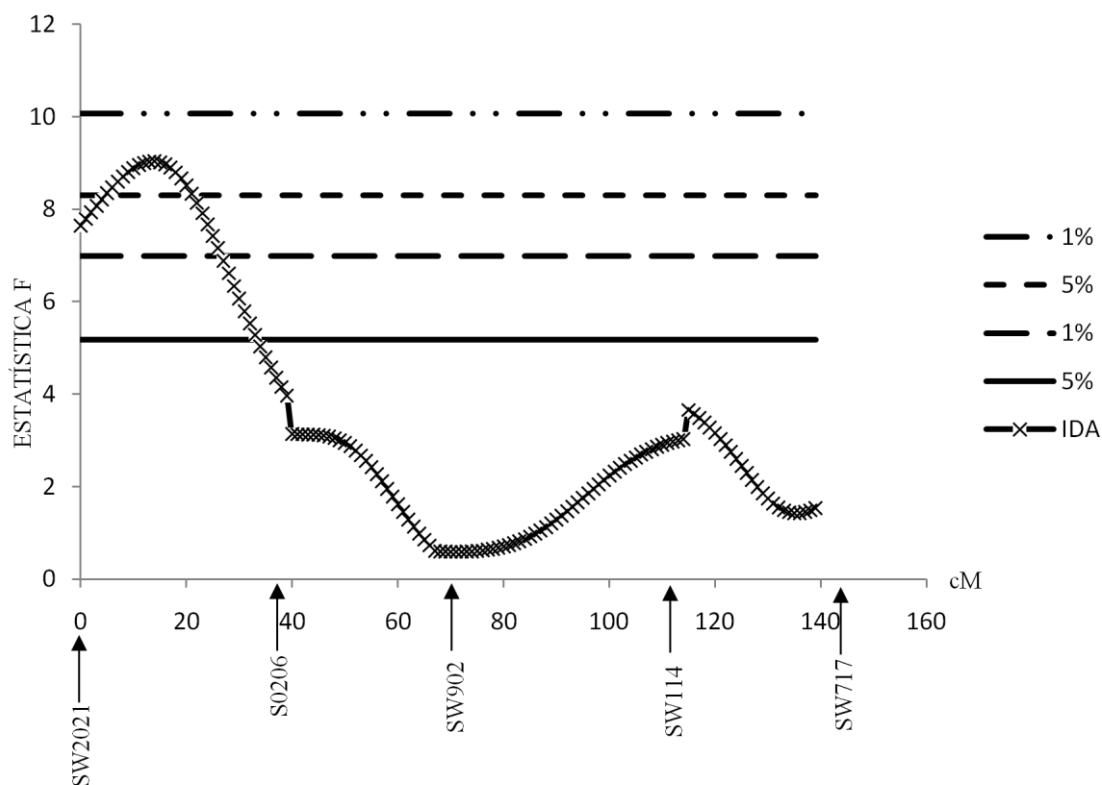


Figura 2 - Estimativas dos valores de F para idade ao abate (IDA) no SSC 3. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (- - -), 5% em nível genômico (- · -) e 1% em nível genômico (- · ·). A posição dos marcadores é indicada por setas.

QTL significativo em nível de 5% cromossômico para NT associado aos alelos da raça Piau foi identificado no cromossomo sexual X, explicando 3,32% da variação desta característica (Figura 3). O número de tetas totais, principalmente se todas forem funcionais nas matrizes, é uma característica importante, pois influencia o desempenho dos leitões durante a fase pré-desmama. A investigação de genes associados a essa característica, que reflete a habilidade materna seria uma informação adicional importante em programas de seleção.

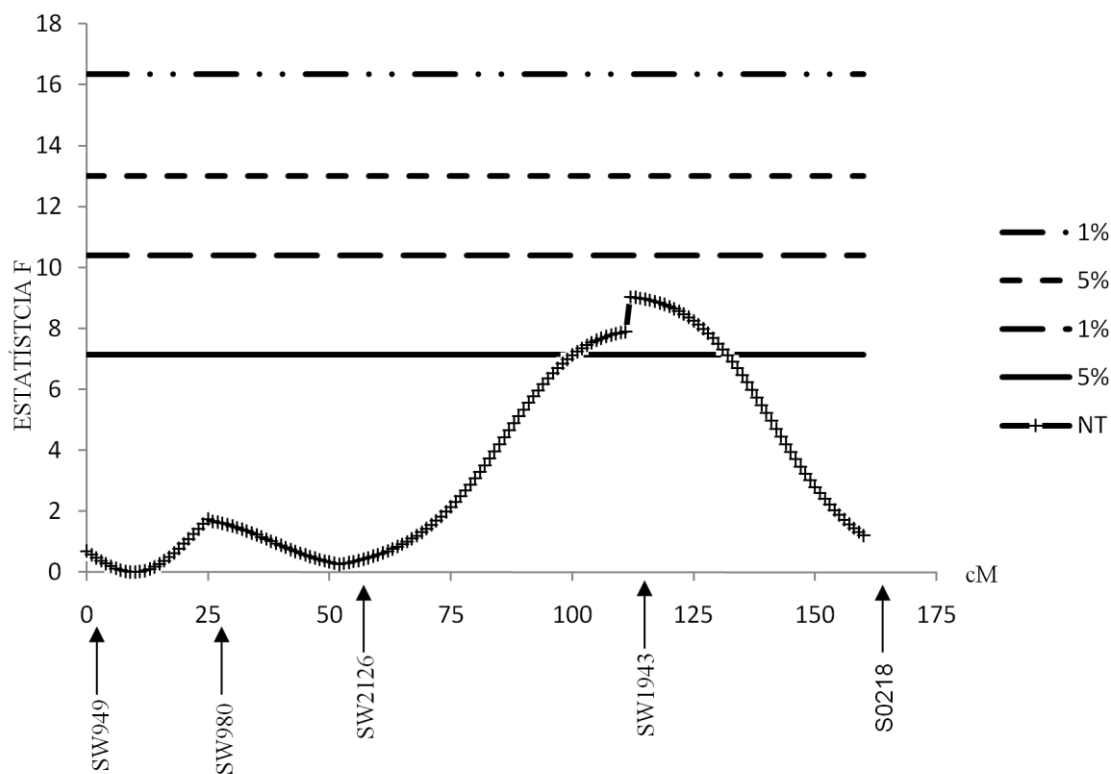


Figura 3 - Estimativas dos valores de F para número de tetas (NT) no SSC X. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (---), 5% em nível genômico (- · -) e 1% em nível genômico (· · ·). A posição dos marcadores é indicada por setas.

Faria et al. (2006) encontraram na mesma população utilizada nesse estudo, um polimorfismo no gene do hormônio do crescimento (G316A) localizado no SSC12 associado número de tetas. Ding et al. (2009) encontraram QTL em nível genômico associados ao número total de tetas em uma população formada por animais da raça Duroc × Erhualian; nos SSC 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 12. Sato et al. (2006) encontraram QTL para número de tetas a 97,1 cM no SSC7 em cruzados Meishan × Duroc ; e Beckmann et al. (2003) um QTL sugestivo em cruzados porco selvagem × Meishan no SSC8.

## CONCLUSÃO

QTL significativos foram encontrados nos cromossomos 1,3,15 e X associados a características de desempenho. O QTL para IDA no SSC3 foi significativo em nível genômico e apresentou  $h^2_Q$  expressiva de 8,80%.

A investigação de genes associados ao número de tetas (que reflete a habilidade maternal) e ao consumo de ração (70% dos custos de produção dos animais) seriam de grande aplicabilidade na seleção assistida por marcadores e, conseqüentemente, em uma maior eficiência e lucros na produção de suínos.

QTL com curvas F pouco definidas poderão ser melhor delimitados com a inclusão de marcadores informativos. As informações dos QTL significativos encontrados servirão de base para identificação de genes, validação e o uso da MAS nas indústrias de suínos, assim como adicionarem maior conhecimento ao desenvolvimento fisiológico das características quantitativas dos suínos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Max F. Rothschild, coordinator do US Pig Genome Project, pela doação dos primers microssátelites.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H. et al. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, v.263, p.1771-1774, 1994.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. 2005a. *Genet. and Molecular Biology*, v.8, n.1, p.88-91.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. 2005b. Relationship between the porcine stress Syndrome gene and carcass and performance trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. *Genet. and Molecular Biology*, v.8, n.1, p.92-96.
- BEECKMANN, P.; SCHRÖFFEL, J.R., J., MOSER, G. et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 1. *Journal Animal Breeding Genetics*, v.120, n.1, p.1-10, 2003.
- BIDANEL, J. P.; MILAN, D.; IANNUCELLI, N. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetics. Selection Evolution*, v.33, p.289-309, 2001.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. . Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.
- CHENG, T.K.W.; LEE, C.H.; HUNG, C.M. et al. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan Pigs. *Theriogenology*, v.54, n.8, p.1225, 2000.

- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.
- DE KONING, D.J.; JANSS, L.L.G.; RATTINK, A. P. et al. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). **Genetics**, v.152, p.1679–1690, 1999.
- DING, N.; GUO, Y.; KNORR, C. et al. Genome-wide QTL mapping for three traits related to teat number in a White Duroc x Erhualian pig resource population. **BMC Genetics**, v.10, n.6, 2009
- DUTHIE, C.; SIMM, G.; DOESCHL-WILSON, A. et al. Quantitative trait loci for chemical body composition traits in pigs and their positional associations with body tissues, growth and feed intake. **Animal Genetics**, v.39, p130–140, 2008.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.634-640, 2006.
- GELDERMANN, H.; MÜLLER, E.; MOSER, G. et al. Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, p.363–393, 2003.
- GILBERT, H., RIQUET, J., GRUAND, J. et al. Detecting QTL for feed intake traits and other performance traits in growing pigs in a Piétrain–Large White backcross. **Animal**, v.4, p.1308–1318, 2010.
- GREEN. P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **Documentation for CRIMAP**. St. Louis:Washington University School of Medicine, 1990.
- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, v.15, n.3, p.27-28, 2001.
- HALEY, C. S.; KNOTT, S. A.; ELSE, J. M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, 136:1195–1207, 1994.
- HOUSTON, R.D.; HALEY, C.S.; ARCHIBALD, A. et al. A QTL affecting daily feed intake maps to Chromosome 2 in pigs. **Mammalian Genome**, v.16, p.464–470, 2005
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1006, 2007.
- KIM, K.S.; LARSEN, N.; SHORT, T. et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. **Mammalian Genome**, v.11, p.131–135, 2000.
- KNOTT, S.A.L.; MARKLUND, C.S.; HALEY, K. et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. **Genetics**, v.149, p.1069- 1080, 1998.
- LIU, G.; JENNEN, D.G.J.; THOLEN, E. et al. A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. **Animal Genetics**, v.38, p.241–252, 2007.
- MALEK, M.; DEKKERS, J. C. M.; LEE, H. K. et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. **Mammalian Genome**, v.12, p.637–645, 2001.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- NEZER, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B. et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. **Nature Genetics**, v.21, n.2, p.155-6, 1999.



- PASZEK, A.A., WILKIE, P.J., FLICKINGER, G.H. et al. Interval mapping of growth in divergent swine cross. **Mammalian Genome**, v.10, p.117–122, 1999.
- PAIXÃO, D.M., SILVA FILHO, M.I., PEREIRA, M.S. et al. Quantitative trait loci for carcass, internal organ and meat quality traits on porcine chromosomes 16, 17 and 18. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.898-901, 2008a.
- PAIXÃO, D.M., GUIMARÃES, S.E.F., SILVA FILHO, M.I. et al. Detecção de locos de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 and 18 de suínos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.10, p.1781-1787, 2008b.
- PÉREZ-ENCISO, M.; CLOP, A.; NOGUERA, J. L. et al. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from Iberian by landrace intercross. **Journal Animal Science**, v.78, p.2525-2531, 2000.
- PIRES, A.V.; LOPES, P.S., GUIMARÃES, S.E.F. et al. Quantitative trait loci mapping for meat quality traits in swine chromosome 6. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5; p608-615, 2005.
- QUINTANILLA, R.; MILAN, D.; BIDANEL, J. P. A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in a cross between Meishan and Large White pig populations. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.193–210, 2002.
- ROHRER, G. A. Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of backfat and weight in a Meishan-White Composite resource population. **Journal Animal Science**, v.78, p. 2547–2553, 2000.
- SANCHEZ, M.P., RIQUET, J., IANNUCELLI, N. et al. Effects of quantitative trait loci on chromosomes 1, 2, 4, and 7 on growth, carcass, and meat quality traits in backcross Meishan - Large White pigs. **Journal of Animal Science**, v.84, p.526–37, 2006.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. **SAS/STAT® user's guide**: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.
- SATO, S.; ATSUJI, K.; SAITO, N. et al. Identification of quantitative trait loci affecting corpora lutea and number of teats in a Meishan × Duroc F2 resource population. **Journal Animal Science**, v.84, n.11, p. 2895-2901, 2006.
- SEATON, G.; HERNANDEZ J.; GRUNCHEC J.A. et al. GridQTL: a Grid Portal for QTL mapping of compute intensive datasets. In: 8TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION. Belo Horizonte, Brazil, 2006. P.13-18.
- SILVA, K.M.; PAIXÃO, D.M.; SILVA, P.V. et al. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p.475-480, 2008.
- TÔRRES, A.D.P. **Suínos: Manual do criador**. Biblioteca Agronômica Melhoramentos. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1968. 428p.
- VAN LAERE, A.S.; NGUYEN, M.; BRAUNSCHWEIG, M. et al. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature**, v.425, p.832–836, 2003.

## CAPÍTULO III

### **Avaliação da expressão de genes selecionados *in silico* em regiões de QTL associados a características de qualidade de carne**

**RESUMO** - A realização do presente estudo teve como objetivo investigar e comparar o nível de expressão de genes mapeados *in silico* em suínos de três diferentes grupos genéticos a partir de informação de regiões de QTL associados a característica de qualidade de carne no cromossomo 1 e no cromossomo 2 de suínos. Para localizar a região sob cada QTL foi utilizada a base de dados do *Ensembl*. Foram utilizados 36 animais de três grupos genéticos (raça naturalizada Piau, linha comercial e cruzados). A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 10, 100, 200 e 400 ng e nas concentrações de primer de 100, 200 e 400 ng por reação. Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando o modelo misto e o efeito da gordura intramuscular (GIM) foi usado como covariável. O programa QPCR\_MIXED, elaborado para gerar comandos do SAS PROC MIXED próprios para analisar dados de RT-qPCR foi utilizado nas análises. Observou-se variação no nível de expressão dos genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, MYOD1, IGF2 e S1PR5 quando comparados animais dos três grupos genéticos. Assim, maiores estudos devem ser feitos nesses genes com o intuito de seqüenciá-los e procurar por mutação causal associada a características de importância econômica na produção de suínos.

Palavra chave: Piau, RT-qPCR, mRNA

## **Evaluation of the expression of genes selected in silico on regions of QTL related to meat quality traits**

**ABSTRACT** - The accomplishment of the present study had as objective evaluate the level of expression of genes selected after the search in silico on QTL regions previously identified. To locate the region under each QTL was used Ensembl database. Thirtysix pigs of three genetic groups (Brazilian Piau breed, Commercial line and Crossbred) were used. The amplification efficiency of each gene was calculated through the construction of curve of dilution in series of cDNA in the concentrations of 10, 100, 200 and 400 ng and in the concentration of primer of 100, 200 and 400 ng by reaction. Data from RT-qPCR were analyzed using mixed model and the effect of intramuscular fat content (IMF) was used as covariate. The software QPCR\_MIXED, SAS designed to generate commands SAS PROC MIXED developed specially to analyse data from RT-qPCR were used in the analyses. It was observed variation on the level of expression of the genes CAPN3, COLL12A1, COL15A1, EPOR, MYOD1, IGF2 e S1PR5. Therefore, larger studies must be performed with such genes in order to sequence for causal mutation related to economic traits in swine production.

keywords: Piau, RT-qPCR, mRNA

## INTRODUÇÃO

Várias características economicamente importantes, como por exemplo, as características associadas à qualidade de carne, são expressas pela ação de muitos genes e são muito influenciadas pela ação do meio ambiente. Segundo, Lande (1981) esses genes poderiam explicar uma proporção considerável da variação genética das características quantitativas, sendo designados QTL (*Quantitative Traits Loci*).

Quatro mil e dezoito QTL associados à qualidade de carne têm sido identificados em diferentes intercruzamentos em ([http:// www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb); USDA, 10/08/2010 data). Contudo, a maioria desses QTL não foi reduzida a genes. Uma das razões é a grande variabilidade nas estimativas dos efeitos e o fato destes se localizarem em intervalos amplos, em torno de 20 a 30 cM.

Recentemente, com o mapeamento completo do genoma de várias espécies, a busca *in silico* por genes posicionados nas regiões de QTL, envolvendo a Genômica Comparativa, em função da similaridade e sintenia existente entre estes genomas, torna-se uma realidade. Lobjois et al. (2008) e Jiang et al. (2002) investigaram a localização de genes em suínos pela comparação do mapeamento *in silico* (suíno/humano). Segundo Wilson et al. (2000), genes candidatos poderiam ser selecionados por comparações de expressão gênica em diferentes tecidos sob investigação.

A Transcriptômica é uma tecnologia que pode ajudar a identificar marcadores moleculares para qualidade da carne (Kwasiboski et al., 2009). O músculo *Longissimus* ou lombo pode ser considerado o corte de carcaça em suíno mais importante economicamente e estudos examinando seu transcriptoma em suínos têm identificado mudanças na expressão de genes associados com características de qualidade de carne (Ponsuksili et al, 2008; Kwasiborski et al., 2009); Tang et al., 2010).

Em estudos prévios de nossa equipe, foram encontrados QTL associados a características de carne: perda por cozimento e perda total no SSC1 e pH 45 minutos após abate no SSC2. Objetivou-se com este estudo realizar a comparação do nível de expressão de sete genes, selecionados após a busca *in silico* nas regiões de QTL citadas acima em suíno Piau, comercial e cruzados, com o intuito de selecionar genes candidatos para posterior análise e associação com fenótipos produtivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Animais, coleta e extração do mRNA**

Foram utilizados 36 animais machos castrados da Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Sendo 12 animais da linha comercial (Landrace X Large White X Pietrain), 12 da raça naturalizada Piau e 12 cruzados (produzidos a partir de machos Piau e fêmeas da linhagem comercial), subdivididos em quatro pesos de abate: 30, 60, 90 e 120 Kg.

Imediatamente após o abate, foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, as quais foram imersas no reagente RNA holder (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) para conservar o padrão de expressão do tecido. Paralelamente, foram coletadas amostras destes mesmos músculos para análise quantitativa da gordura intramuscular (GIM), pelo método do extrato etéreo (AOAC, 1990), expresso em porcentagem de GIM na carne fresca. Maiores detalhes sobre os animais foram descritos por Serão et al. (2010).

O RNA total foi isolado do *Longissimus dorsi* com RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA). A concentração total do RNA foi estimada no espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Munique, Alemanha) e a qualidade em Agilent 2100 Bioanalyzer (© Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.). As amostras foram mantidas a -70° C até as reações de síntese de cDNA. A síntese de cDNA foi realizada utilizando ProtoScript® M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) e sua concentração foi estimada por espectrofotometria. Posteriormente, as amostras de DNA foram mantidas a -20° C, até a realização das reações de PCR em tempo real.

### **Análise *in silico***

A seleção dos genes para realização do RT-qPCR foi feita *in silico*, sob a região entre os marcadores SW781 e o marcador S0113 (Intervalo de confiança=55,8-80,5cM) associados aos QTL para perda por cozimento significativo a 5% em nível genômico,  $F=8,6$ , explicando 5,48% da variação fenotípica da característica e para perda total significativo a 5% em nível cromossômico,  $F=6,76$ , explicando 3,64%, ambos localizados na mesma região do cromossomo 1 (SSC1). No SSC2 selecionou-se a região entre os marcadores SW395 e SW1883 (Intervalo de confiança=42-72,4 cM) do

QTL significativo a 1% em nível cromossômico associado ao pH 45 minutos *post mortem*,  $F=7,37$ , que explica 8,56% da variação fenotípica da característica. Estes QTL foram mapeados em uma população F2 formada a partir do cruzamento de machos Piau e fêmeas da linha comercial (Landrace X Large White X Pietrain) e o efeito aditivo desses QTL foi atribuído aos alelos vindo da linha comercial. Maiores detalhes sobre a população foram descritos por Band et al., (2005), Faria et al. (2006), Paixão et al (2008 a, b).

Para localizar a região sob cada QTL foi utilizada a base de dados do *Ensembl* ([http://www.ensembl.org/Sus\\_scrofa](http://www.ensembl.org/Sus_scrofa)). A seqüência e a posição no genoma de suínos, conforme alinhamento no *Ensembl* para cada marcador microssatélite flanqueador estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Nome, seqüência e posição no genoma de suínos dos marcadores que delimitaram curvas F de QTL associados a características de qualidade de carne.

SSC/MARCADOR	SEQUÊNCIA	ENSEMBL <sup>1</sup> (Mb)
1/SW781	FORWARD:CAACTACGTCCTTCTTTTTGCC REVERSE:GATCCTTGGTCTGGAACTTG	75.994.187-75.994.382
1/S0113	FORWARD: AGCCTCCGTGTAATATAATCCTTG REVERSE: AGGACATCTCTCATTCTCTGGCAG	212.027.735-212.027.860
2/SW395	FORWARD:TTCCAAGGTTATGGAGATATCC REVERSE: GATCCCTACCTCACACCACA	48.406.041-48.406.200
2/SW1883	FORWARD:CCATTTGGGGTCATTTTTTG REVERSE: CTATTGGTGGTAAAGGAGCAGC	75.059.441- 75.059.583

<sup>1</sup> Posição no genoma dos suínos conforme alinhamento no banco de dados *in silico Ensembl* ([http://www.ensembl.org/Sus\\_scrofa](http://www.ensembl.org/Sus_scrofa)).

Uma lista de genes dentro do intervalo de confiança e os números de acesso do *Ensembl* para a região da seqüência codificante de cada gene candidato foi acessada no *Entrez* e no *LocusLink* do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/)). Seqüências codificantes foram recuperadas do *GenBank* e usadas como *query* para as buscas no *Blast*. O programa *Blast parser* ([http://greengene.uml.edu/programs/NCBI\\_Parse.html](http://greengene.uml.edu/programs/NCBI_Parse.html)) foi usado para fazer a filtragem dos resultados da pesquisa *Blast* e selecionar apenas *hits* com porcentagem de identidade maior do que 0,00001 e *score* 100. Após a filtragem dos resultados, cada alinhamento foi salvo como um arquivo de texto individual. Para examinar as classes funcionais e as vias metabólicas dos genes identificados, foi usado o programa *BLAST2GO* (<http://www.blast2go.org>). As seqüências foram anotadas de acordo com os seguintes parâmetros: Similarity-Hit- Filter de 5, GO weight de 5, E-

value de 0,00001 e HSP length cutoff 33. Os *blast hits* foram anotados contra a base do GO (*Gene Ontology*) e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Após essas análises uma lista de genes foi obtida e alguns destes genes foram selecionados para as análises de RT-qPCR. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/primerQuest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/primerQuest)) fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do *GeneBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Os *primers* utilizados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Sequência de nucleotídeos dos *primers* (5'- 3'), número de acesso no GeneBank e a espécie que a originou

GENES <sup>1</sup>	SEQUENCIA DE NUCLEOTÍDEOS <sup>2</sup>	ACESSO	ESPÉCIE
ACTB	F: CAACTTTGCAACAGCGGAC R: GAGTGTTCCCTCGGGCTTTAG	AY550071	Sus scrofa
CAPN3	F: AGTACGTCATTGTGCCCTCCACTT R: TGGCCGATCCACGGAGATTGTATT	NM_001009212.1	Ovis aries
COL12A1	F:AGCCAGTGGAGAAGAAACCTGGAA R: TTCTTCCCACACTCCAAGAGCCAT	NM_004370.5	Homo sapiens
COL15A1	F:ACTGTTGTCCACCTACCGAGCATT R: AGTACTTGGCCCTTGAGGTTCACT	NM_001855.3	Homo sapiens
EPOR	F: ACCCTTATGAGAACAGCCTTG R: CTGGATAAATGTTGGGCTTGG	NM_214292.1	Sus scrofa
IGF2	F: TCCCCATGTCAGGCTAGTC R: GGAGATACAGACCAAGCCAAT	NM_213883.2	Sus scrofa
MYOD1	F: CAACTTTGCAACAGCGGAC R: GAGTGTTCCCTCGGGCTTTAG	NM_001002824.1	Sus scrofa
MYO 6	F:AAGGAGGAGGAATCCCAACAGCAA R: ATCACTGATGAGCTCGGCTTCACT	NM_214021.1	Sus scrofa
TNC	F: TGAGGGCCAGTTTGACACCTTCAT R: GCCATACCGCTTCTTGTTCGCAAT	NM_214230.1	Sus scrofa
S1PR5	F:ATGCCTCTGGTCTTTGTGAG R:ACACCCAATGCCTCAGTAAC	NM_001123109.1	Sus scrofa

<sup>1</sup>ACTB-β-actina, CAPN3-calpaina 3, COL12A1-colágeno tipo XII α 1, COL15A1-colágeno tipo XV α1, EPOR- receptor eritropoetina, IGF2- fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2, MyoD1-diferenciação miogênica, Myo 6 – miosina VI, TNC – Tenascina C, S1PR5- receptor 5 de esfingosina, <sup>2</sup>F=Forward e R:Reverse

### Teste de eficiência e RT-qPCR

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 10, 100, 200 e 400 ng e de primer de 100, 200 e 400 ng por reação. A partir dos dados obtidos, um gráfico de Ct

(*threshold cycle*) versus o  $\log_{10}$  da quantidade de cDNA utilizada na reação foi construído (dados não mostrados). Foi utilizada a regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta para determinar a eficiência de amplificação, de acordo com a equação desenvolvida por Pfaffl (2001):

$$E = 10 \left( \frac{-1}{\text{inclinação da reta}} \right) - 1$$

As reações de RT-qPCR foram efetuadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, EUA) e as condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; e extensão a 60°C durante 60 segundos. Nos testes de eficiência ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual de temperatura de 60°C a 95°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação.

A amplificação dos genes alvo e da referência ( $\beta$ -actina) foi realizada em diferentes *well* e em duplicatas na mesma placa de reação. A quantidade do gene alvo, normalizada para a  $\beta$ -actina, foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  (Pfaffl, 2001; Livak & Schmittgen, 2001).

### **Análise Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (raça) x 4 (peso de abate), com três repetições por tratamento (peso ao abate).

Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando o modelo misto abaixo. O efeito da gordura intramuscular (GIM) foi usado como covariável, uma vez que níveis superiores de GIM ( $P < 0,05$ ) foram observados para suínos da raça Piau e Cruzados aos 120 kg de peso ao abate (Serão et al., 2010). Caso o efeito da covariável não fosse significativo, a mesma era retirada do modelo para as análises subsequentes.



$$y_{ijkl} = PRG_{ijk} + A_{(ij)l} + D_{ijk} + b_1(G_{ijl} - \bar{G}) + b_2(G_{ijl} - \bar{G})^2 + e_{ijkl}$$

Em que:

$y_{ijkl}$  é o nível de expressão mensurado no gene k no animal l da raça j no peso i;  $PRG_{ijk}$  é o efeito da interação entre o peso i e raça j e expressão do gene k;  $A_{(ij)l}$  é o efeito aleatório do animal l dentro da interação entre o peso i e a raça j,  $A_{(ij)l} \sim N(0, \sigma_A^2)$ ;  $D_{ijk}$  é o efeito aleatório amostra-específico (comum aos dois genes),  $D_{ijk} \sim N(0, \sigma_D^2)$ ;  $G_{ijl}$  é o conteúdo de gordura intramuscular do animal l da raça j no peso i, sendo  $\bar{G}$  o conteúdo de gordura intramuscular médio e  $b_1$  e  $b_2$ , respectivamente, os coeficientes de regressão linear e quadrático;  $e_{ijkl}$  é o termo de erro aleatório,  $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$ .

As análises estatísticas foram realizada utilizando a macro QPCR\_MIXED desenvolvido em SAS (v. 9.1.3), elaborada para gerar comandos do SAS PROC MIXED próprios para analisar dados de RT-qPCR, assumindo efeitos aleatórios independentes para gene referência e genes alvos em cada replicada biológicos (Steibel et al., 2009).

A significância das estimativas dos contrastes foi avaliada mediante o teste t de *Student*.

## RESULTADOS

O gene TNC apesar de ser obtido de sequência de banco de dados de suínos não amplificou nos animais utilizados no presente trabalho. O gene MYO6 também obtido a partir de banco de dados de suínos foi retirado das análises após apresentar eficiência negativa para todas as concentrações de primer e cDNA testadas. Em todas as demais reações a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene referência foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno, tal como descrito por Livak & Schmittgen (2001). As concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cDNA utilizados nas reações de amplificação são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3-Concentração de primer, cDNA e eficiência da reação (E) para os genes analisados.

Gene	Primer (nM)	cDNA (ng/reação)	E (%)
ACTB	200	100	100,00
CAPN3	200	10	91,14
COL12A1	200	100	100,00
COL15A1	200	100	96,26
EPOR	200	100	100,00
IGF2	100	100	89,98
MYOD1	200	100	89,94
S1PR5	200	10	89,96

<sup>1</sup> ACTB-β-actina, CAPN3-calpaína 3, COL12A1-colágeno tipo XII α 1, COL15A1-colágeno tipo XV α1, EPOR- receptor eritropoetina, IGF2- fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2, MyoD1-diferenciação miogênica , S1PR5- receptor 5 de esfingosina .

Foi observado entre os grupos genéticos variação no nível de expressão dos genes CAP3, COL12A1 e COL15A1 selecionados sob o QTL previamente descrito para perda por cozimento e para perda total no cromossomo 1, e para os genes EPOR , MYOD1, IGF2 e S1PR5 selecionados sob o QTL pH 45 minutos *post mortem* no SSC2.

A expressão do gene calpaína 3 (CAPN3) no presente estudo foi 2,99 (P<0,01) vezes maior nos animais comerciais aos 30 Kg de peso ao abate do que nos animais cruzados. Já nos animais Piau também aos 30 Kg de peso ao abate, a expressão do gene CAPN3 foi 4,69 (P<0,001) vezes maior nestes animais do que nos animais cruzados (Tabela 4).

Tabela 4 – Expressão relativa do gene CAPN3 (calpaína 3) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg, com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	2,99 ±0,57**	1,65±0,57	-1,41±0,57	-1,37±0,57
Comercial-Piau	-1,54±0,57	1,51±0,57	-1,00±0,57	1,12±0,57
Cruzado-Piau	-4,63±0,57***	-1,09±0,57	-1,40±0,57	1,48±0,57

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene CAPN3 representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados –Piau=maior expressão dos animais Piau, \* (P<0,05) e \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

No presente trabalho, o gene colágeno tipo XII α-1 (COL12A1) foi 5,07 (P<0,01), 3,41 (P<0,05) e 5,43 (P<0,01) vezes mais expresso nos animais Piau do que nos animais comerciais nos pesos de abate 30, 60 e 90 Kg, respectivamente. Sendo também mais

expresso em Piau, no contraste cruzados-Piau, com valores de 5,97 ( $P<0,01$ ) e 7,22 ( $P<0,01$ ) vezes nos pesos 30, 90 Kg, respectivamente. Já no peso de abate de 120 Kg observou-se a maior expressão do COL12A1 nos animais cruzados do que em animais Piau 4,77 ( $P<0,01$ ) vezes (Tabela 5).

Tabela 5 – Expressão relativa do gene COL12A1 (colágeno tipo XII  $\alpha$  1) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg, com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	1,17 ±0,86	-1,39±0,86	1,32±0,86	-1,91±0,86
Comercial-Piau	-5,07±0,86**	-3,41±0,86*	-5,43±0,86**	2,49±0,86
Cruzado-Piau	-5,97±0,86**	-2,45±0,86	-7,22±0,86**	4,77±0,86**

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene COL12A1 representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados -Piau=maior expressão dos animais Piau, \* ( $P<0,05$ ) e \*\*( $P<0,01$ ) e \*\*\*( $P<0,001$ ).

Na Tabela 6, está demonstrada a expressão do COL15A1 que foi maior nos animais cruzados do que nos animais comerciais (7,88 vezes no peso de abate de 30Kg e 6 vezes no peso de abate de 60 Kg). Nos animais Piau a expressão foi 7,88 vezes ( $P<0,01$ ) e 5,79 ( $P<0,05$ ) vezes maior do que nos animais comerciais nos pesos de abate de 30Kg e 90 Kg, respectivamente.

Tabela 6 – Expressão relativa do gene COL15A1(colágeno tipo XV  $\alpha$ 1) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg, com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	-7,88 ±0,948**	-1,16±0,948	-6,00±0,948**	-2,24±0,948
Comercial-Piau	-7,88±0,948**	-1,16±0,948	-5,79±0,948*	-2,24±0,948
Cruzado-Piau	-1,00±0,948	-1,00±0,948	1,03±0,948	-1,00±0,948

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene COL15A1 representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados -Piau=maior expressão dos animais Piau, \* ( $P<0,05$ ) e \*\*( $P<0,01$ ) e \*\*\*( $P<0,001$ ).

A expressão do gene receptor eritropoetina (EPOR) foi três vezes ( $P<0,01$ ) maior nos animais cruzados do que em animais comerciais no peso de abate de 120 Kg. Foi 3,92 ( $P<0,01$ ) e 5,89 ( $P<0,001$ ) vezes mais expresso em cruzados do que em animais Piau nos pesos de abate de 60 e 120 Kg, respectivamente. E nos animais comerciais

expressaram 2,79 (P<0,01) e 2,66 (P<0,05) vezes mais o do que os animais Piau nos pesos de abate 30 Kg e 60 Kg, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 – Expressão relativa do gene EPOR (receptor eritropoetina) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg, com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	2,00 ±0,590	-147±0,590	1,01±0,590	-3,00±0,590**
Comercial-Piau	2,79±0,590**	2,66±0,590*	1,28±0,590	1,96±0,590
Cruzado-Piau	1,39±0,590	3,92±0,590**	1,26±0,590	5,89±0,590***

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene EPOR representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados –Piau=maior expressão dos animais Piau, \* (P<0,05) e \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

No contraste animais comerciais versus cruzados, a expressão do MyoD1 foi 25,55 (P<0,001), 7,05 (P<0,01) e 13,54 (P<0,01) vezes maior nos animais cruzados do que nos animais comerciais nos pesos de abate de 30, 60 e 120 Kg, respectivamente. Apresentou-se 15,04 (P<0,01) vezes mais expresso em Piau do que nos animais comerciais no peso de abate de 30 Kg. E a expressão do gene MyoD1 nos animais cruzados no peso de abate de 120 Kg foi 12,19 (P<0,01) vezes maior do que em animais Piau. (Tabela 8).

Tabela 8 – Expressão relativa do gene MyoD1 (diferenciação miogênica) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg, com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	-25,55±1,129***	-7,05±1,129**	1,22±1,129	-13,54±1,129**
Comercial-Piau	-15,04±1,129**	-2,13±1,129	1,08±1,129	-1,11±1,129
Cruzado-Piau	3,65±1,129	3,31±1,129	-1,13±1,129	12,19±1,129**

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene MyoD1 representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados –Piau=maior expressão dos animais Piau, \* (P<0,05) e \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

Observou-se a expressão do gene do IGF2 6,44 (P<0,05) maior nos animais comerciais do que nos animais Piau no peso de abate de 60 Kg (Tabela 9). Para o gene IGF2 também se observou no presente trabalho, o efeito quadrático significativo da co-variável gordura intramuscular (P< 0,001) e de acordo com as estimativas dos coeficientes de regressão,  $b_1 = -6,6239$  (P=0,0115) e  $b_2 = 2,3723$  (P=0,0023), nota-se que a

expressão do IGF2 é mínima para o valores de gordura intramuscular em torno de 1,3960% na carne fresca.

Tabela 9 – Expressão relativa do gene IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg, com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	-1,09±1,172	2,33±1,172	3,27±1,172	-2,94±1,172
Comercial-Piau	-1,02±1,172	6,44±1,172*	1,02±1,172	-1,61±1,172
Cruzado-Piau	1,06±1,172	2,75±1,172	-3,20±1,172	1,83±1,172

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene IGF2 representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados –Piau=maior expressão dos animais Piau, \* (P<0,05) e \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

A expressão do gene S1PR5 foi 5,38 (P<0,001) vezes maior nos animais cruzados do que nos animais comerciais no peso de abate 120Kg. Observou-se maior expressão dos animais Piau de 3,65 (P<0,001), 3,50 (P<0,001) e 3,55 (P<0,001) vezes em relação aos animais comerciais nos pesos de abate 30, 90 e 120 Kg, respectivamente. Os animais Piau também apresentaram maior expressão do S1PR5 (de 3,67 vezes (P<0,001) do que os animais cruzados no peso de abate de 30 Kg (Tabela 10).

Tabela 10 – Expressão relativa do gene S1PR5 (receptor 5 de esfingosina) entre os diferentes grupos genéticos nos pesos de abate de 30, 60, 90 e 120 Kg. Com seus respectivos erro- padrão.

Contrastes <sup>1</sup>	Expressão relativa			
	30 Kg	60 Kg	90 Kg	120 Kg
Comercial-cruzados	1,00±0,508	-1,04±0,508	-1,66±0,508	-5,38±0,508***
Comercial-Piau	-3,65±0,508***	-1,13±0,508	-3,50±0,508***	-3,55±0,508***
Cruzado-Piau	-3,67±0,508***	-1,07±0,508	-2,10±0,508	1,51±0,508

<sup>1</sup>Valores negativos da expressão relativa do gene S1PR5 representam: no contraste comercial-cruzados=maior expressão dos animais cruzados; no contraste comercial- Piau=maior expressão nos animais Piau; no contraste cruzados –Piau=maior expressão dos animais Piau, \* (P<0,05) e \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

## DISCUSSÃO

Os suínos Piau, raça naturalizada brasileira, são caracterizados por baixo desempenho, pequeno tamanho de leitegada, rusticidade, adaptabilidade a condições

pobres de manejo e alimentação e destacam-se pelo grande acúmulo de gordura subcutânea (Guimarães & Lopes, 2001).

Suíños Piau, tipo banha e suínos da linha comercial, tipo carne mostram-se divergentes em relação à deposição de tecido adiposo. A estratégia de utilização de grupos genéticos divergentes pode ser usada para estudos de genes candidatos, uma vez que aumenta a chance de se encontrar variação alélica do gene entre os grupos.

As calpaínas são uma família de enzimas proteolíticas neutras (calpaína 1, m-calpaína e p94, também conhecidas como calpaína 1, 2 e 3, respectivamente), que se caracteriza pela sua atividade proteolítica sendo dependente da concentração de  $Ca^{+2}$  (Dayton, 1982). Em contraste com a calpaína 1 e m-calpaína, a calpaína 3, usada no presente trabalho é expressa quase que exclusivamente nos músculos esqueléticos (Sorimachi et al., 1989).

Sendo uma enzima proteolítica, a CAPN3 tem papel importante na integridade das células musculares e na retenção da água na carne uma vez que esta se liga a proteínas, assim apesar da degradação de proteínas ser um fator natural que acontece na carne *post mortem*, maiores expressões do gene CAPN3 poderiam amentar e acelerar essa degradação, o que resultaria em maior perda de água na carne. Corroborando com essa suposição Huff-Lonergan & Lonergan (2005) demonstraram que menores níveis de calpaína *post mortem* por meio do aumento da expressão do gene da calpastatina reduzem a degradação de proteína e com isso reduz a formação de canais de gotejamento na carne. Melody et al. (2004); Zhang et al. (2006); Scheffler & Gerrard (2007) têm demonstrado que a degradação proteica tem papel importante na perda de água na carne *post mortem*. Segundo Armstrong (1990), aumento nas concentrações de  $Ca^{+2}$  nas fibras musculares *post mortem* é uma fonte de ativação de proteases cálcio dependentes, de fosfatases e de fosfolipases, como o sistema calpaína que influencia a perda de água por gotejamento na carne.

No presente estudo um alto nível de expressão de calpaína foi encontrado na raça Piau, contudo nos estudos de QTL associados a perda total (efeito aditivo=0,89) e perda de cozimento (efeito aditivo=0,78) em uma população F2 (Piau X linha comercial) foram os alelos vindos da linha comercial que contribuíram para as maiores perdas. Contudo, a contribuição da atividade das calpaínas na determinação da capacidade de retenção de água no processo de conversão do músculo para carne é complexa e dinâmica (McBryan et al., 2010) e maiores estudos nos genes da família das calpaínas são necessários.

Lobiois et al. (2008) encontraram a expressão diferencial do gene CAPN3 em suínos provenientes do cruzamento de animais de linha comercial pela técnica de microarranjo. Zhang et al. (2006) encontraram correlação na expressão do gene da  $\mu$ -calpaína com perda por gotejamento na carne suína *post mortem*.

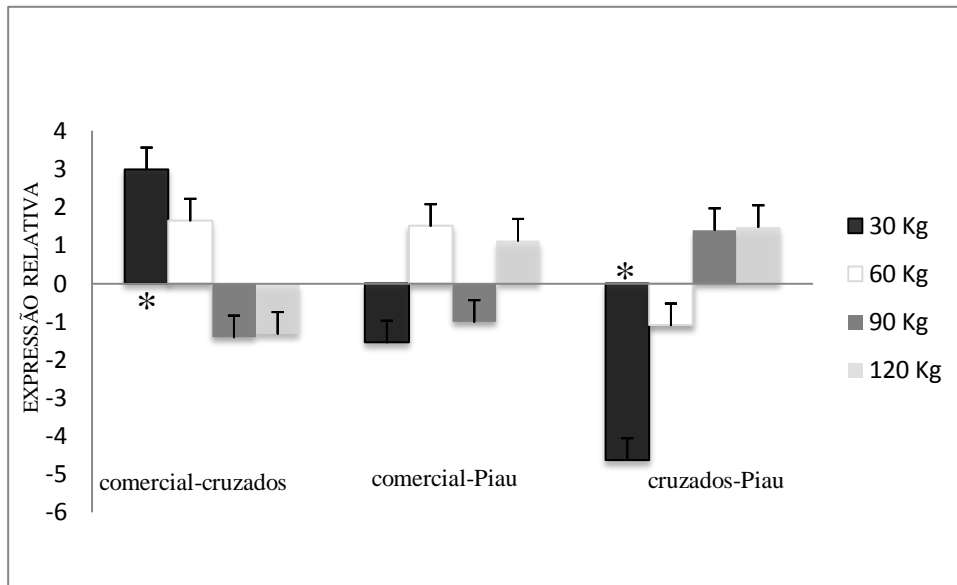


Figura 1- Comparação da expressão relativa do gene CAPN3 (calpaína 3) entre os grupos genéticos comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.

De acordo com os dados do GO, o colágeno é um componente da matriz extracelular que tem como função a adesão celular, assim maiores ou menores adesões entre as células ou entre as células e a matriz extracelular poderiam estar associadas com perda de água na carne, corroborando com essa suposição McBryan et al. (2010) correlacionaram o aumento da expressão do gene COL1A1 (colágeno tipo 1  $\alpha$ -1) e o decréscimo da expressão do gene calpastatina com aumento de perdas por gotejamento na carne em suínos Large White. Ponsuksili et al. (2008) encontraram correlação positiva da expressão do gene COL1A1 (colágeno tipo 1  $\alpha$ -1) com perda por gotejamento em uma população formada por animais F2 Pietrain e Duroc. No presente trabalho, os genes COL12A1 (Figura 2) e COL15A1 (Figura 3) foram diferentemente expressos nos animais cruzados e Piau, cujo alelos não foram associados a maiores perdas de água na carne em estudos de QTL encontrados em população F2 (Piau X linha comercial).

Contudo, aumento de colágeno na raça Piau e cruzados poderia ser avaliado em estudos futuros, com o propósito de avaliar a correlação da expressão de genes codificadores do colágeno com maciez da carne nos pesos de abate de 30, 60 e 90 Kg, uma vez que não foi encontrada interação da gordura intramuscular nesses pesos de abate e nesses grupos genéticos (Serão et al, 2010) e pelo fato de vários estudos demonstrarem que as propriedades do colágeno como: tamanho da fibra, tipo genético, conteúdo total e solubilidade estão intimamente relacionados com a textura da carne (Bailey, 1985). Segundo, Lawrie (2005), grande parte da variação no conteúdo de tecido conectivo se deve ao efeito genético e a variabilidade individual.

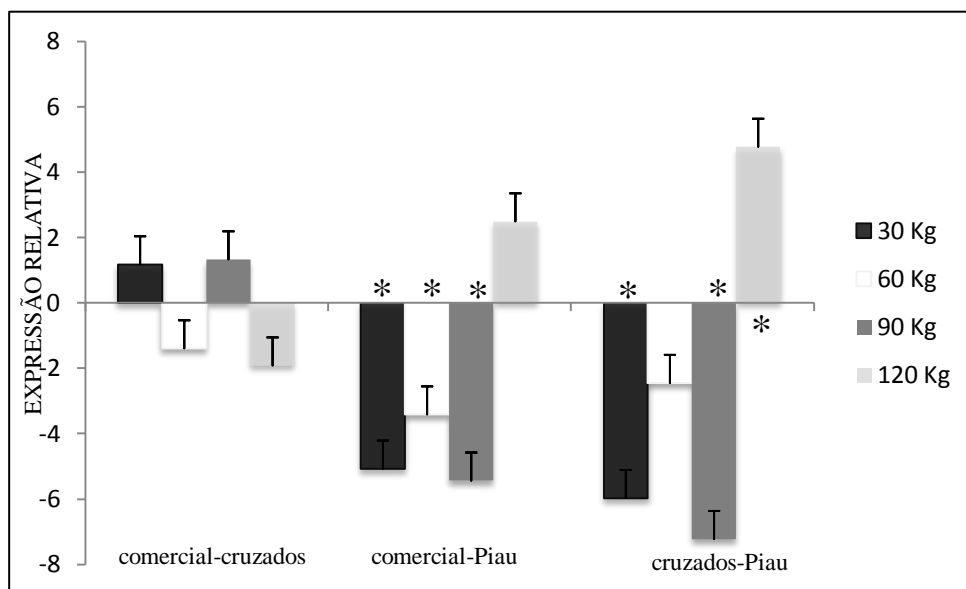


Figura 2- Comparação da expressão relativa do gene COL12A1 (colágeno tipo XII  $\alpha$ -1) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.



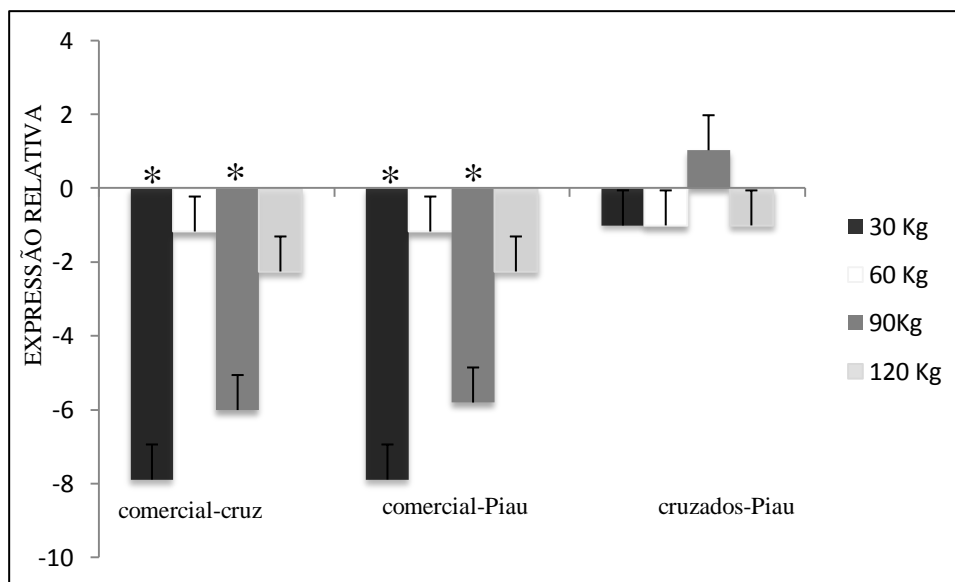


Figura 3- Comparação da expressão relativa do gene COL15A1 (colágeno tipo XV  $\alpha$ -1) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30,60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.

Observou-se no presente trabalho a expressão significativa do gene EPOR em animais comerciais e cruzados (Figura 4), sendo que os alelos vindo dos animais comerciais foram associados com diminuição de pH 45 minutos *post mortem* (efeito aditivo=0,11) em estudos de QTL em população F2 no SSC2. De acordo com os dados do GO o gene EPOR é um membro da família de receptores de citocina, que são proteínas que regulam as funções celulares. Após a vinculação com eritropoetina, o receptor de eritropoetina ativa a tirosina quinase Jak2 que ativa diferentes vias intracelulares, como por exemplo, fatores de transcrição (STAT5A) *in vivo*; essas informações não poderiam explicar diretamente a influência do gene EPOR em características de pH na carne. Contudo, Wimmers et al. (2007) encontraram após análises de expressão (Microarranjo, RT-qPCR) e de polimorfismo, o gene EPOR como candidato a influenciar pH 24 horas *post mortem* ( $P < 0,003$ ) e perda por cozimento em *Longissimus dorsi* em suínos cruzados Duroc e Pietrain. Assim maiores estudos nesse gene poderão ser realizados nos grupos genéticos do presente estudos, com intuito de encontrar variantes alélicas associadas a pH *post mortem*.

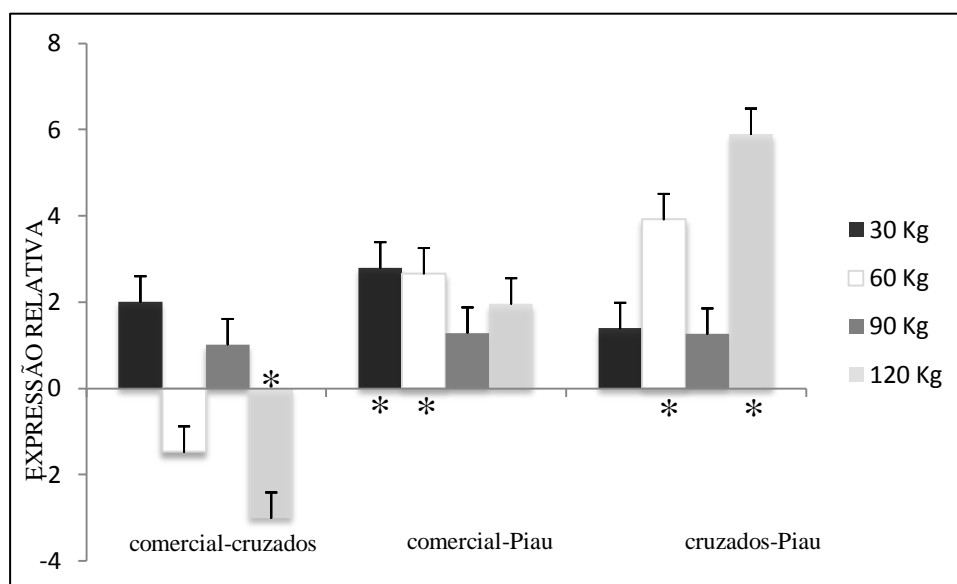


Figura 4- Comparação da expressão relativa do gene EPOR (receptor de eritropoetina) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30 60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.

Os genes da família MyoD (myo-DI, myf-5, miogenina e myf-6 ou mfr-4) estão envolvidos com desenvolvimento dos músculos nos mamíferos. Os três primeiros genes desta família estão relacionados com o processo hiperplásico pré-natal e o último (myf-6) com o crescimento muscular pós- natal (Lodish et al., 1995). A expressão pós- natal dos genes MyoDI, myf5 e miogenina é muito menor do que a expressão pré natal e está associada e se encontra apenas em células satélites (Grounds et al., 1992; Koishi et al., 1995). As células satélites fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto (Foschini et al. 2004). Maiores níveis de expressão dos genes MyoD1 e miogenina parecem estar associados ao maior número de células satélites nos músculos ativos (Beilharz et al. 1992), que poderão estar relacionado à taxa de crescimento muscular, ou seja maiores quantidades de carne na carcaça. Contudo, no presente trabalho maiores nível de expressão do gene MyoD1 foram encontrados nos animais cruzados em diferentes pesos de abate e em animais Piau, tipo banha, na idade de abate de 30 Kg (Figura 5).

Para maior entendimento da influência da expressão do gene MyoD1 em animais Piau versus comercial, a expressão desse gene em idade pré-natal poderá ser investigada, uma vez que o conhecimento fisiológico e bioquímico de como ocorre a deposição de tecido muscular é uma ferramenta muito importante para a manipulação do crescimento, obtendo-se melhores índices produtivos com maior quantidade e qualidade de carne na carcaça.

Te Pas et al. (2000) encontraram maiores níveis de expressão da miogenina, myf-5, e MyoD1 em músculo de suínos adultos provenientes de linhas selecionadas para alto desempenho do que animais de linha selecionadas para deposição de carne magra. Lin & Hsu (2005) não encontraram diferença significativa na expressão do MyoDI entre amostras neonatais de *Longissimus dorsi* de suínos Duroc e Tayuano em análise de microarranjo.

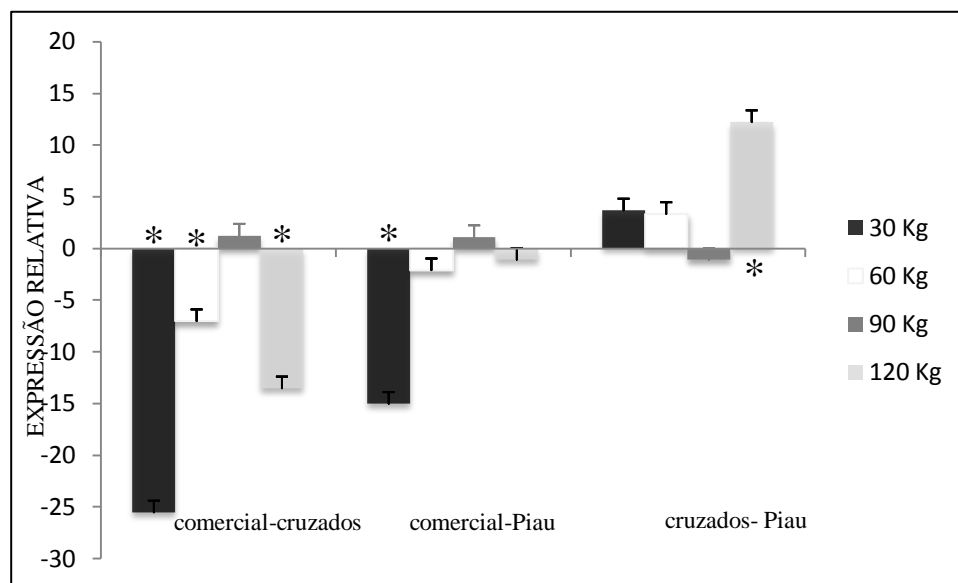


Figura 5- Comparação da expressão relativa do gene MyoD1 (diferenciação miogênica) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.

Na espécie suína, Nezer et al., 1999 identificaram um QTL com expressão paterna afetando crescimento muscular, deposição de gordura e tamanho de coração, identificado na extremidade distal do cromossomo 2, este QTL explicou 15–30% da variação fenotípica da massa muscular e 10–20% da variação da espessura de toucinho. Esta região do SSC2 mostrou conservada sintenia com o cromossomo humano (HSA) 11p15, o qual é muito estudado pela presença de um *cluster* de genes que apresentam

*imprinting*. Entre estes genes, o IGF2, foi identificado como o principal gene candidato para o QTL devido ao seu envolvimento no crescimento e na diferenciação muscular (Florini et al., 1995), podendo estar envolvido em processos de proliferação e diferenciação de células satélites (Florini et al., 1991; Oksbjerg et al., 2004).

Van Laere et al. (2003) demonstraram que o QTL localizado no SSC2 é causado por uma substituição no íntron 3 do gene IGF2 (IGF2-intron3-G3072A), essa mutação teve sua frequência aumentada acidentalmente na seleção de animais para desempenho e produção de carne magra, estando ausente nas populações de Meishan e suínos selvagens. Corroborando com os resultados de Van Laere, observou-se no presente trabalho a expressão significativa do gene IGF2 somente nos animais comerciais no peso de abate de 60 Kg, animais selecionados para desempenho (Figura 6).

Gardan et al. (2008) observaram em músculo esquelético o aumento na expressão do gene IGF2 ( $P < 0,01$ ) em suínos que possuíam a mutação (IGF2-intron3-G3072A) em relação aos animais que não a possuíam. Van den Maagdenberg et al. (2007) observaram diferenças na atividade proteolítica e lipolítica em animais mutantes para o gene IGF2 (IGF2-intron3-G3072A), sugerindo que o maior percentual de massa muscular para esse genótipo estaria associado com diminuição da degradação protéica, aumento de fusão de mioblastos, ou ambos.

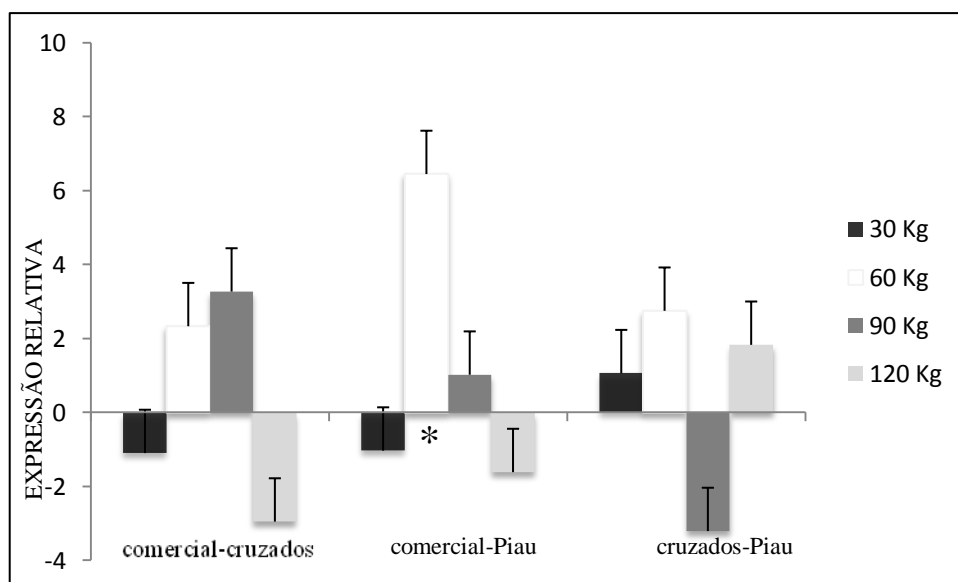


Figura 6- Comparação da expressão relativa do gene IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.

Apesar de não ter sido encontrada relação do S1PR5 com características de qualidade de carne na literatura, esse foi incluído nas análises por estar sob a região de QTL previamente identificado no SSC2 para pH 45 minutos *post mortem* e pelo fato de ser pouco estudado em mamíferos.

Os esfingolípídeos mais abundantes em tecidos animais na membrana celular são a esfingosina e os glicosfingolípídeos (Pozzi et al. 2002). De acordo com os dados do GO, genes da família de receptores de esfingosina têm papel importante na sobrevivência, comunicação e proliferação celular. Cinco receptores S1P têm sido identificados e caracterizados em mamíferos, sendo os receptores 4 (S1PR4) e 5 (S1PR5) pouco caracterizados (Meng & Lee, 2009). Encontrou-se no presente estudo, a expressão significativa do gene S1PR5 nos animais cruzados no peso ao abate 120 Kg e nos animais Piau em diferentes pesos de abates (Figura 7).

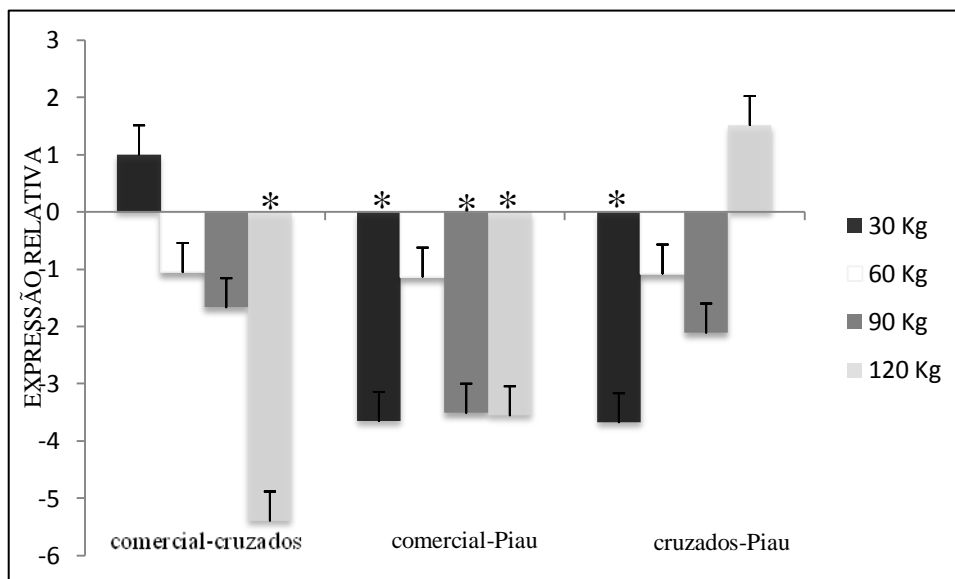


Figura 7- Comparação da expressão relativa do gene S1PR5 (receptor 5 de esfingosina) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O asterisco indica o grupo que apresentou diferença significativa.

A identificação de genes com variação no nível de expressão associado a QTL não necessariamente irão identificar os genes que controlam a característica, mas produzem informações sobre o mecanismo molecular envolvido (Rothschild 2004).

## CONCLUSÃO

Diante das evidências experimentais associando os genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, MyoD1, IGF2 e EPOR com características de qualidade de carne suína, maiores estudos devem ser feitos nesses genes diferencialmente expressos no presente trabalho, com o intuito de seqüenciá-los e procurar por mutação causal associada a essas características de suma importância econômica na produção de suínos. Além do gene S1PR5 pouco caracterizado.

Maiores estudos dos genes colágenos existentes em suínos são decisivos para compreender as mudanças estruturais que acontecem nas propriedades do colágeno ao longo da vida dos animais, sendo estas muito importantes para determinar a contribuição desta proteína para a textura e para a perda de água na carne.

Além do mais, prover maiores informações a cerca da genômica envolvida no desenvolvimento de características quantitativas, que envolve a maioria das características de importância econômica na produção animal, geram informação adicional aos programas de melhoramento, aumentando sua acurácia, seu direcionamento e sua velocidade de implementação.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis* (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- Armstrong RB (1990) Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **22**, 429-435.
- Bailey, A. J., Light, N. D. *CIBA Found. Symp.* 114, 80–96, 1985
- Band, G.O., Guimarães, S.E.F., Lopes, P.S., Schierholt, A.S., Silva, K.M., Pires, A.V., Benevenuto Júnior, A.A., Gomide, L.A.M. (2005) Relationship between the Porcine Stress Syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. *Genetics and Molecular Biology*, **28**:88-91.
- Beilharz, M. W., Lareu, R.R. Garrett, M. D., Grounds, K.L., Fletcher, S. (1992) Quantitation of muscle precursor cell activity in skeletal muscle by Northern analysis of MyoD and myogenin expression: Application to dystrophic (mdx) mouse muscle. *Molecular Cellular Neuroscience*, **3**, 326–331.
- Bustin, S. A., Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal Biomolecular Techniques*, **15**, 155-166.
- Cagnazzo, M.; Te Pas, M.F.; Priem, J., de Wit, A.A.C., Pool, M.H., Davoli, R., Russo, V. (2006) Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. *Journal Animal Science*, **84**, 1-10.
- Daí, F.; Feng, D, Cao, Q., Ye, H., zhang, C., Xia, W., Zuo, J. (2009) Developmental differences in carcass, meat quality and muscle fibre characteristics between the Landrace and a Chinese native pig. *South African journal of Animal science*, 39, 4.
- Dayton, W. R. (1982). Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products. *Biochimica et Biophysica Acta*, 709, **2**, 166–172.
- Erkens, T., Van Poucke, M., Vandesompele, J., Goossens, K., Van Zeveren ,A., Peelman, L.J. (2006) Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnol*, **6**:41.
- Faria, D.A.; Guimarães, S.E.F.; Lopes, P.S., Pires, A.V., Paiva, S.R., Solero, B.P., Wenceslau, A.A. (2006) Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. *Genetics and Molecular Biology*, **29**, 634-640.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., McWade, F.J. (1995). IGFs, muscle growth, and myogenesis. *Diabetes Research*, **3**, 73–92.
- Florini, J. R., D. Z. Ewton, and K. A. Magri. (1991). Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu. Review Physiology*, **53**, 201–216.
- Foschini RMSA, Ramalho FS, Bicas HEA. Células satélites musculares. (2004). *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, **67**, 4, 681-7.
- Gardan, D., Gondret, F., Van Den Maagdenberg, K., Buys, N., De Smet, S., Louveau, I. (2008). Lipid metabolism and cellular features of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in pigs differing in IGF-II genotype. *Domestic Animal Endocrinology*, **34**, 1, 45-53.

- Guimarães, S.E.F.; Lopes, P.S. (2001) Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. *Ação Ambiental*, **15**, 27-28.
- Grounds, M.D.; Garrett, K.L.; Lai, M.C., Wright, W.E., Beilharz, M.W. (1992) Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Research*, **267**, 99–104.
- Haley, C. 1999. **Advances in quantitative trait locus mapping**. In: Dekkers, J.C.M., Lamont, S.J., Rothschild, M.F. (Eds.), From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics. Iowa State University, Ames, 47–59.
- Harper, G.S.; Allingham, P.G., Feuvre, R.P. (1999). Changes in connective tissue of M. semitendinosus as a response to different growth paths in steers. *Meat Science*, **53**, 107-114.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M (2005): Mechanisms of water holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, **71**, 194-204.
- Koishi, K.; Zhang, M.; McLennan, I.S., Harris, A.J.(1995) MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Developmental Dynamics*, **202**, 244–254.
- Koohmaraie, M., Shackelford, S. D. (1991). Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed beta adrenergic agonists. *Journal of Animal Science*, **69**, 2463–2471.
- Kwasiborski, A., Rocha, D., Terlouw, C. (2009) Gene expression in Large White or Duroc-sired female and castrated male pigs and relationships with pork quality. *Animal Genetics*, **40**, 852-862.
- Jiang, Z., Robinson, J.A.B., Verrinder Gibbins, A.M., Gibson, J.P., Archibald, A.L., Haley, C.S. 2002 **Mapping of QTLs for prolificacy traits on SSC8 using a candidate gene approach**. In: Proceedings of the Seventh World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, 633–636.
- Lande, R. (1981) The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics*, **88**, 3-4, 541-553.
- Lawrie, R. A. 2005 **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 384.
- Lin, C.S., Hsu, C.W. (2005). Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *Jornal Animal Science*, **83**; 2075-2086.
- Livak, K. J., Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCt method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lobjois, V.; Liaubet, L.; Sancristobal, M., Glénisson, J., Fe`ve, K., Rallie`res, J., Le Roy, P., Milan, D., Cherel, P., Hatey, F. (2008). A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. *Animal Genetics*, **39**, 147-162.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A. et al. **Molecular Cell Biology**, 3.ed., cap.13, p.556-561, 1995.
- Mcbryan, J., Hamill, M.R., Davey, G. (2010) Identification of suitable reference genes for gene expression analysis of pork meat quality and analysis of candidate genes associated with the trait driss loss. *Meat Science*, **86**, 2, 436-9.



- Melody, J.L., Lonergan, S.M., Rowe, L.J., Huiatt, T.W., Mayes, M.S., Huff-Lonergan, E. (2004): Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal Animal Science*, **82**, 1195-1205.
- Meng H, Lee VM (2009) Differential expression of sphingosine-1- phosphate receptors 1–5 in the developing nervous system. *Developmental Dynamics*, **238**, 487–500.
- Nezer, C., Moreau, L., Brouwers, B., Coppieters, W, Detilleux, J.. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nature Genetics*, **21**, 155–156.
- Norman, G.A. (1982). Effect of breed and nutrition on the productive traits of beef cattle in south east Brazil. *Meat Science*, **6**, 2, 79-96.
- Oksbjerg N., Gondret F., Vestergaard, M. (2004). Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animal Endocrinology*; **27**, 219–40.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, 45, 2001.
- Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W. (2002) Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF, IGF-2 receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*, **22**, 91.
- Paixão, D. M., Guimarães, S. E. F., Silva Filho, M.I., Lopes, P.S., Pereira, M.S., Solero, B.P. n(2008) Detecção de Loci de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 e 18 para características de desempenho em suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **37**, 1781-1787.
- Paixão, D. M., Silva Filho, M. I., Pereira, M. S., Lopes, M.S., Barbosa, L., Souza, K.R.S., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.F. (2008) Detection of quantitative trait loci on chromosomes 16, 17 and 18 for carcass, internal organs and meat quality traits in pigs. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 98-901, 2008.
- Plastow, G. S., Carrión, D. S., Gil, M., J. A. García-Regueiro, J. A., Fonti Furnols, M., Gispert, M., Oliver, M. A., Velarde, A., Guàrdia, M. D., Hortós, M., Ruis, M. A., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A., Sosnicki, A. (2005) Quality pork genes and meat production. *Meat Science*, **70**, 3, 409–421.
- Ponsuksili, S., Jonas, E., Murani, E., Phatsara, C., Srikanthai, T., Walz C., Schwerin, M., Schellander, K., Wimmers, K., (2008). Trait Correlated Expression Combined With Expression Qtl Analysis Reveals Biological Pathways And Candidate Genes Affecting Water Holding Capacity Of Muscle. *BMC Genomics*, **9**, 367.
- Pozzi, C. R., Arcaro, J. R. P., Júnior, I. A., Fagundes, H., Corrêa, B. (2002) Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. *Ciência Rural*, **32**, 901.
- Rothschild, M.F. (2004) Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. *Genetics Research*, **83**, 1–6.
- Sanders, K., Bennewitz, J., Kalm, E. (2006) Wrong and Missing Sire Information Affects Genetic Gain in the Angeln Dairy Cattle Population. *Journal Dairy Science*, **89**, 315–321.

Scheffler, T.L., Gerrard, D.E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science*, **77**, 7-16.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT ® 9.2 User's Guide**, 2nd ed. Cary, NC, 2009.

Serão, N., Ribeiro, A., Verardo, L., Braccini, J.N, Gasparino, E., Campos, C., Lopes, P., Guimarães, S. (2010) Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *Animal Breeding and Genetics*, JABG-09-0151.R2. (aprovado).

Silva, K.M., Paixão, D.M., Silva, P.V. et al. (2008) Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 475-480.

Silva, K.M., Guimarães, S.E.F.; Lopes, P.S., Nascimento, C.S., Lopes, M.S., Amaral, M.M.C. (2009). Mapeamento de Locus de Características Quantitativas para Desempenho no Cromossomo 4 de suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **38**, 474-479.

Steibel, J.P., Poletto, R., Coussens, P. M., Rosa, G. J.M. (2009) A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data, *Genomics*, **94**, 146–152.

Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., Suzuki, K. (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium- dependent protease distinct from both m- and p-types specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 33, 20106–20111.

Tang, R., Yu, B., Zhang, K., Guo, X., Tian, G., Huang, Z., Chen, X., Chen, D. (2010) Effects of nutritional level on pork quality and gene expression of  $\mu$ -calpain and calpastatin in muscle of finishing pigs. *Meat Science*, **85**, 768-771.

Terra N.N.; Fries L.L.M. **Pork quality and processing**. International Virtual Conference on Pork Quality, November 16th to December 16th, 2000, p.1–4.

Theil, P. K., Sørensen, I. L., Nissen, P.M., Oksbjerg, NM. (2006) Temporal expression of growth factor genes of primary porcine satellite cells during myogenesis in response to exogenous insulin. *Animal Science Journal*, **77**, 3, 330-337.

Te Pas, M. F. W., F. J. Verburg, C. L. M. Gerritsen, and K. H. de Greef. (2000) Messenger ribonucleic acid expression of the MyoD gene family in muscle tissue at slaughter in relation to selection for porcine growth rate. *Journal Animal Science*, **78**, 69–77.

Van Laere, A.S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., et al. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*; **425**, 832–6.

Vallet, J. L., and B. A. Freking. (2006). An erythropoietin receptor (EPOR) gene polymorphism 552 (SNP) alters EPOR mRNA in fetal liver of swine during early gestation. *Journal Animal Science*, **84**(Suppl. 1), 450.

Vallet, J.L., Freking, B.A., Leymaster, K.A., Christenson, R.K. (2005). Allelic variation in the erythropoietin receptor gene is associated with uterine capacity and litter size in swine. *Animal Genetics*, **36**, 97-103.

Vallet, J. L., Klemke, H. G., Christenson, R. K. Pearson., P. L. (2003). The effect of breed and intrauterine crowding on fetal erythropoiesis on day 35 of gestation in swine. *Journal Animal Science*, **81**, 2352-2356.

- Van den Maagdenberg K, Claeys E, Stinckens A, Buys N, De Smet S.(2007). Effect of age, muscle type, and insulin-like growth factor- II genotype on muscle proteolytic and lipolytic enzyme activities in boars. *Jornal Animal Science* ,**85**, 953–60.
- Zhang, W.G., Lonergan, S.M., Gardner, M.A., Lonergan, E.H. (2006). Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and  $\mu$ -calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Science* 2006, **74**:578-585.
- Wayne ML, McIntyre M. (2002) Combining mapping and arraying: Na approach to candidate gene identification. *Proceeding of the. National. Academy Science*, **99**,14903-14906.
- Wilson, M.E., Sonstegard, T.S., Smith, T.P.L. (2000) Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. *Genesis*, **26**, 9–14
- Wimmers, K.E., Murani, M.F., Te Pas, K.C., Chang, R., Davoli, J.W., Merks, H., Henne, M., Muraniova, N., da Costa, B., Harlizius, K., Schellander, I., Bll, S., Braglia, A.A., de Wit, M., Cagnazzo, L., Fontanesi, D., Prins, S. Ponsuksili. (2007). Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. *Animal Genetics*, **38**, 474–484.
- Wong, M.L.; Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, **39**, 75-85.

## CAPÍTULO IV

### **Avaliação de marcadores microssatélites para testes de paternidade e rastreabilidade em suínos**

**Resumo:** Nos últimos anos, com a busca por uma maior eficiência e qualidade na produção animal, tem crescido o interesse pelo uso de marcadores moleculares tanto na seleção de reprodutores, como no auxílio para identificação de paternidade e até mesmo na identificação do próprio animal. O objetivo deste trabalho foi avaliar 28 marcadores microssatélites para serem empregados em testes de paternidade e rastreabilidade em suínos. Para tanto, foi realizada a extração, a manipulação e a subsequente análise do DNA genômico de 60 famílias. Após a genotipagem, o programa CERVUS foi utilizado para estimar a frequência alélica, o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e a probabilidade de identificação animal (PI). As probabilidades de exclusão de paternidade combinada de todos os 28 marcadores foram estimadas para as situações em que o genótipo da mãe é conhecido ( $P_1$ ) e para a situação em que genótipo da mãe não está disponível ( $P_2$ ). Os marcadores apresentaram um PIC médio de 0,70 e foi observada uma  $P_1 > 99,99\%$  e uma  $P_2 = 99,97\%$ . A PI para o conjunto 28 marcadores foi de  $4,00 \times 10^{-28}$ . Os marcadores avaliados neste estudo foram altamente informativos e podem ser considerados adequados para análises de paternidade e de rastreabilidade em suínos.

Palavras-chave: exclusão de probabilidade, Piau, identificação animal

## **Evaluation of microsatellites markers for paternity and traceability analyses in pigs**

Abstract: In recent years, due the search for greater efficiency and higher quality in animal production, it has been observed a growing interest in the use of molecular markers in animal selection and as well for paternity identification and animal identification. The objective of this study was to evaluate 28 microsatellite markers to be used in paternity and traceability analysis in pigs. Genomic DNA of 60 families was extracted and analysed. After genotyping, CERVUS program was used to estimate the allele frequency, the polymorphic information content (PIC) and probability of animal identification (PI). The combined exclusion probability of the 28 markers was estimated for the situations where the mother's genotype is known ( $P_1$ ) and the situation where the mother's genotype is not available ( $P_2$ ). It was observed a mean  $PIC=0.70$  and a  $P_1 > 99.99\%$  and  $P_2 = 99.97\%$ . The PI for all 28 markers was  $4.00 \times 10^{-28}$ . The markers evaluated in this study were highly informative and can be considered efficient for paternity and traceability analysis in pigs.

Keywords: paternity exclusion, Piau, animal identification.

## INTRODUÇÃO

Os testes de parentesco têm como objetivo estudar a existência de relação entre os animais avaliados, pois a metade do material genético de um indivíduo é transmitida aos seus descendentes. Com o rápido desenvolvimento de técnicas moleculares e com a busca por maior eficiência e qualidade na produção animal, tem crescido o interesse pelo uso de marcadores moleculares tanto na seleção de reprodutores, como no auxílio para identificação de paternidade e até mesmo na identificação do próprio animal.

Por meio dos testes de DNA é possível eliminar erros nos registros de pedigree, aumentando a acurácia na estimativa do valor genético de um reprodutor, assegurando o sucesso dos programas de melhoramento. Inúmeros estudos observaram que os erros de pedigree reduzem o ganho genético (Van vleck, 1970; Ron et al., 1996; Carneiro et al., 1999; Israel & Weller, 2000; Banos et al., 2001; Sanders et al., 2006) e consequentemente geram perdas econômicas.

Além disso, por meio de marcadores genéticos é possível rastrear a origem de um animal ou produto animal nas várias etapas da cadeia produtiva, desde a fazenda até o produto final. A falta de confiança dos consumidores, em particular em relação aos alimentos de origem animal, deve-se a várias razões, incluindo a segurança alimentar e alterações sócio-econômicas (Dalvit et al., 2007). Sem dúvida, a rastreabilidade corresponderá à exigência dos consumidores em relação a alimentos seguros e com alta qualidade.

Diferentes tipos de marcadores estão disponíveis para análises de identificação animal e verificação de dados de pedigree. Porém, um dos marcadores mais utilizados nestes tipos de análises têm sido os marcadores microssatélites (Balorma et al., 2008), pois são marcadores co-dominantes, abundantes no genoma e altamente polimórficos.

O principal propósito da realização do presente trabalho foi avaliar 28 marcadores microssatélites para serem empregados em testes de paternidade e rastreabilidade em suínos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram genotipadas 60 famílias de suínos formadas pelo cruzamento de machos da raça Piau com fêmeas de duas linhagens comerciais, pertencentes à Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil. A extração, a manipulação e a subsequente análise do DNA genômico foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia animal (LABTEC) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue coletado imediatamente após o abate utilizando-se o método de extração por precipitação com sal (Miller et al., 1988), ou por meio de amostras de pêlo ou tecido da cauda (no caso de leitões) utilizando tampão de extração contendo: Tris HCL pH 8.0 1 Molar, EDTA 0,5 Molar, NAACL 5 Molar, SDS e RNase A (10 µg/µL).

A escolha dos primers de microssatélites a serem avaliados foi baseada na disponibilidade e informatividade dos marcadores, doados pelo coordenador do US Pig Genome (*USDA-Cooperative State Research, Education, and Extension Service through National Research Support*) e usados previamente em estudos de mapeamento genômico concluídos no LABTEC. As reações de PCR foram realizadas utilizando termocicladores MJ Research PTC 100-96<sup>®</sup> com Master Mix Gotaq<sup>®</sup> Green Master (Promega Corporation, Madison, EUA) e cada 12 µL de reação possuiu 25ng de DNA genômico.

Os seguintes microssatélites foram usados: SW2035, S0112, SW2443, SW240, SW395, S0036, S002, SW58, SJ024, SW1987, SW1057, S0003, S0228, S0064, S0212, S0017, SW21, SW830, S0071, S0106, SW344, SW857, SW936, SW2517, SW2427, S0120, SW980 e S0218. As sequências dos primers desses marcadores podem ser acessadas em [www.usda.gov/genome/swine/swine.html](http://www.usda.gov/genome/swine/swine.html) (http://www.marc.usda.gov/genome/swine/swine.html).

Os fragmentos amplificados foram analisados em eletroforese capilar no ABI 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystem<sup>™</sup>, utilizando o software Genescan<sup>®</sup> e GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no Laboratório de Genômica, Bioagro-UFV. A probabilidade de exclusão de paternidade de cada microssatélite e posteriormente, as probabilidades de exclusão combinada de todos os marcadores em duas diferentes situações (P1: o genótipo da mãe é conhecido; P2: o genótipo da mãe não é conhecido) e a PI (probabilidade de dois animais apresentarem o

mesmo genótipo para um marcador) foram estimadas conforme descrito por Jamieson & Taylor (1997) baseado nas frequências alélicas obtidas por meio do Programa CERVUS (Kalinowski et al., 2007), que também foi utilizado para estimar o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e para quantificar a informatividade dos marcadores (Bolstein et al., 1980).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os marcadores avaliados neste estudo apresentaram em média seis alelos, variando de três a 10 alelos para os marcadores S0218 e SW344, respectivamente. A heterozigosidade observada (HO) variou entre 0,42 (SW980) e 0,92 (SW2443) (Tabela 1). O grau de informatividade de um marcador está diretamente relacionado com o PIC. O PIC médio observado foi de 0,70 e segundo Bolstein et al.(1980), um PIC maior que 0,5 é considerado altamente polimórfico.



Tabela 1 - Número de animais e de alelos; Heterozigosidade Esperada (HE), Heterozigosidade observada (HO) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os 28 marcadores avaliados em suínos.

Locus	Animais	Alelos	HE	HO	PIC
SW2035	276	6	0,76	0,75	0,72
S0112	282	6	0,77	0,82	0,74
SW2443	218	6	0,82	0,92	0,80
SW240	196	7	0,75	0,82	0,72
SW395	282	8	0,74	0,77	0,71
S0036	231	4	0,72	0,76	0,67
S0002	229	7	0,81	0,86	0,78
SW58	253	5	0,62	0,72	0,56
SJ024	235	7	0,68	0,76	0,65
SW1987	265	9	0,81	0,77	0,78
SW1057	200	7	0,82	0,80	0,80
S0003	221	6	0,77	0,87	0,73
S0228	263	5	0,78	0,77	0,75
S0064	263	8	0,75	0,75	0,72
S0212	286	6	0,68	0,74	0,65
S0017	232	8	0,78	0,89	0,76
SW21	293	6	0,72	0,60	0,68
SW830	280	5	0,68	0,61	0,64
S0071	217	6	0,68	0,78	0,63
S0106	257	7	0,85	0,88	0,82
SW344	290	10	0,76	0,74	0,73
SW857	224	8	0,82	0,90	0,80
SW936	235	5	0,77	0,84	0,74
SW2517	280	9	0,74	0,68	0,70
SW2427	217	5	0,66	0,82	0,60
S0120	322	7	0,70	0,50	0,64
SW980	231	5	0,50	0,42	0,46
S0218	232	3	0,46	0,62	0,49
Média	335	6,50	0,73	0,76	0,70

A probabilidade de exclusão de paternidade combinada dos 28 marcadores foi 99,99% quando os genótipos da mãe foram introduzidos na análise (P<sub>1</sub>) e igual a 99,97% quando os dados da mãe foram tomados como desconhecidos (P<sub>2</sub>) (Tabela 2). Esses resultados sugerem com um alto grau de confiança a exclusão de paternidade para qualquer cruzamento entre as raças de suínos estudadas. O alto valor observado para P<sub>2</sub> é importante, uma vez, que em muitos programas industriais de melhoramento os genótipos das mães não são mensurados.

Tabela 2 - Probabilidade de exclusão de paternidade para os casos em que o genótipo da mãe é conhecido (P<sub>1</sub>), probabilidade de exclusão de paternidade quando o genótipo da mãe não está disponível (P<sub>2</sub>) e probabilidade de dois animais apresentarem o mesmo genótipo para um marcador (PI) para os 28 marcadores microsatélites avaliados.

Locus	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	PI
SW2035	0,649	0,472	0,101
S0112	0,621	0,443	0,088
SW2443	0,533	0,357	0,056
SW240	0,640	0,460	0,098
SW395	0,650	0,468	0,100
S00364	0,709	0,535	0,131
S0002	0,551	0,374	0,062
SW58	0,787	0,636	0,206
SJ024	0,709	0,523	0,130
SW1987	0,553	0,376	0,063
SW1057	0,526	0,351	0,055
S0003	0,627	0,448	0,090
S0228	0,612	0,431	0,082
S0064	0,632	0,448	0,091
S0212	0,718	0,536	0,136
S0017	0,585	0,403	0,072
SW21	0,685	0,510	0,121
SW830	0,727	0,550	0,143
S0071	0,737	0,567	0,155
S0106	0,487	0,317	0,045
SW344	0,624	0,446	0,092
SW857	0,541	0,365	0,059
SW936	0,624	0,445	0,088
SW2517	0,653	0,476	0,107
SW2427	0,757	0,600	0,177
S0120	0,721	0,550	0,145
SW980	0,886	0,716	0,290
S0218	0,894	0,783	0,360
Media	0,9999	0,9996	4,00 x 10 <sup>-28</sup>

Valores altos de probabilidade de exclusão em suínos também foram evidenciados por Rohrer et al. (2007),  $P_1$  de: 99,81% e  $P_2$  de 99,99%, investigando um painel com 10 marcadores microssatélites (SW21, SW818, SW1370, SW1824, SWR1829, SW1891, SW1904, SW2156, SW2519 e SW2527 ). Schwarz et al. (2005) recomendaram para teste de paternidade em uma linha comercial de suíno Landrace o uso dos marcadores: S0097, S0105, S0106, S0230, SW129, SW344, SW1808, SW2441, SW2517 e SWR1101 por possuírem alto número de alelos com frequências iguais. Nechtelberger et al. (2001) com um conjunto de 15 microssatélites (S0005; S0090; S0101; S0155; S0355; S0386; SW24; SW240; SW857; SW951; SW72; SW936; SW911; S0228; S0227) observaram probabilidade de exclusão de paternidade em suínos na raça Landrace de  $P_1=99,87\%$  e  $P_2=96,69\%$ , Piétrain de  $P_1=99,92\%$  e  $P_2=98,35\%$  e de Large White de  $P_1=99,98\%$  e  $P_2=99,09\%$ .

A procura de marcadores genéticos que são capazes de discriminar cada animal é uma realidade. A PI combinada de todos os marcadores avaliados neste trabalho foi igual a  $4,00 \times 10^{-28}$ . Isso significa que a chance de dois animais terem os mesmos genótipos para todos os 28 microssatélites é de um em  $2,5 \times 10^{27}$ . Estes resultados sugerem que os marcadores avaliados são eficientes para a identificação de suínos e então podem ser empregados em análises de rastreabilidade, uma vez que, a população mundial de suínos é de aproximadamente um bilhão de animais (FAO, 2008).

Debate-se sobre como o sistema de rastreamento deve funcionar e vários autores vêm comparando, em suas publicações, a eficácia de diferentes métodos de rastreabilidade (Meuwissen, et al., 2003; Marchant, 2002; Barcos, 2001), para tanto, Rohrer et al. (2007), encontraram PI de  $5,4 \times 10^{-13}$ , utilizando 10 marcadores microssatélites em linhas comerciais de suínos.

O mercado consumidor interno e principalmente externo, atualmente, exige um controle rigoroso na segurança dos produtos animais e o painel de marcadores avaliados nesse estudo pode ser usado para esse propósito.

## CONCLUSÕES

O conjunto dos 28 marcadores microssatélites avaliados foi altamente informativo e pode ser considerado adequado para formar um painel de marcadores para análises de paternidade, sendo uma importante ferramenta para os programas de melhoramento. Ambas as probabilidades de exclusão (quando os genótipos da mãe foram introduzidos na análise e quando foram considerados como desconhecidos) apresentaram valores acima de 99%; esses resultados sugerem com alto grau de confiança a exclusão de paternidade na população avaliada.

Além do mais, os marcadores avaliados são eficientes para a identificação animal, podendo ser empregados em análises de rastreabilidade, que é uma exigência de suma importância econômica nos mercados consumidores atuais

## REFERÊNCIAS

- BANOS, G.; WIGGANS, G.R.; POWELL, R.L. Impact of Paternity Errors in Cow Identification on Genetic Evaluations and International Comparisons. **Journal Dairy Science**, v.84, p.2523–2529, 2001.
- BARCOS, L. O. Recent developments in animal identification and the traceability of animal products in international trade. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v.20, n.2, p.640–651, 2001.
- BOLSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BOLORMAA, S.; RUVINSKY, A.; WALKDEN-BROWN, S. et al. DNA-based parentage verification in two Australian goat herds. **Small Ruminant Research**, n.80, p.95-100, 2008.
- CARNEIRO, P.L.S.; EUCLYDES, R.F.; SILVA, M.A.E. et al. Efeito da seleção errônea de machos sobre ganhos genéticos, utilizando-se simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, p.264-268, 1999.
- DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M. Genetic Traceability of livestock products: A review. **Meat Science**, v.77, p.437-449, 2007.
- FAO [2008]. Live Animals. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor> Acesso em: 18-03-2010.
- JAMIESON, A.; TAYLOR, S.C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v.28, p.397–400, 1997.
- ISRAEL, C.; WELLE, J.I. Effect of Misidentification on Genetic Gain and Estimation of Breeding Value in Dairy Cattle Populations. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.1, p.181-187, 2000.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, n.5, p.1099-1106, 2007.
- MEUWISSEN, M.P.M., VELTHUIS, A.G.J., HOGEVEEN, H. et al. Traceability and certification in meat supply chains. **Journal of Agribusiness**, v.21, n.2, p.167–181, 2003.
- MARCHANT, J. Secure animal identification and source verification. **JM Communications**, UK. Copyright Optibrand Ltd., LLC, 2002.
- MEUWISSEN, M.P.M., VELTHUIS, A.G.J., HOGEVEEN, H. et al. Traceability and certification in meat supply chains. **Journal of Agribusiness**, v.21, n.2, p.167–181, 2003.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C.; STUR, I. et al. DNA microsatellite analysis for parentage control in austrian pigs. **Animal Biotechnology**, v.2, p.141 – 144, 2001.
- ROHRER, G.A.; FREKING, B.A.; NONNEMAN, D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. **Animal Genetics**, n.38, v.3, p.253-258, 2007.
- RON, M.; BLANC, Y; BAND, M. et al. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implications for Genetic Improvement. **Journal Dairy Science**, v.79, p.676-68, 1996.

- SANDERS,K.; BENNEWITZ,J.; KALM, E. Wrong and Missing Sire Information Affects Genetic Gain in the Angeln Dairy Cattle Population. **Journal Dairy Science**, v.89, p.315–321, 2006.
- VAN VLECK, L. D. 1970. Misidentification in Estimating the Paternal Sib Correlation. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.10, p.1469-1474.
- WEIR, G. S. **Genetic Data Analysis II**. 2. ed. Sunderland MA: Sinauer Associates Inc., 1996.

## CONCLUSÃO GERAL

As informações dos QTL significativos encontrados, serviram e servirão como base para estudos futuros, quando o mapeamento fino auxiliará na identificação de genes e no melhor entendimento dos fenótipos produtivos de suínos.

Nas regiões dos QTL associadas a características de qualidade de carne no cromossomo 1 e no cromossomo 2 encontrou-se sete genes (CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, IGF2, MyoD1 e S1PR5) candidatos a influenciar características de qualidade de carne em suínos .

As raças naturalizadas Piau representam um campo de variabilidade a ser explorado nos programas de melhoramento.

O conjunto dos 28 marcadores microssatélites avaliados mostraram-se altamente informativos e adequados para formar um painel de marcadores para análises de paternidade e rastreabilidade em suínos.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho e apresentados nos diferentes capítulos foram relevantes e contribuíram com maiores informações a cerca da genômica envolvida no desenvolvimento das características quantitativas de importância econômica avaliadas na produção de suínos, como também mostraram a efetividade de testes de identificação individual de suínos.

## REFERÊNCIA

- Abipecs – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (2010). Estatísticas. Avaliado:<http://www.abipecs.com.br>.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress syndrome gene and carcass and performance traits in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.92-96, 2005.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. (2005b). Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality traits of F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.88-91, 2005.
- BANOS, G., WIGGANS, G.R. Powell, R.L. Impact of Paternity Errors in Cow Identification on Genetic Evaluations and International Comparisons. **Journal Dairy Science**, v.84, p.2523–2529, 2001.
- BARON, E. E.; MARTINEZ, M. L; VERNEQUE, R. S et al. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. **Genetics and Molecular Biology**, .v.25, n.4, p.389-394, 2002.
- BRYNE, P.F.; McMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and candidate gene approach. **Probe**, v.7, p.24-27, 1996.
- CARNEIRO, P.L.S.; EUCLYDES, R.F.; SILVA, M.A.E. et al. Efeito da seleção errônea de machos sobre ganhos genéticos, utilizando-se simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, p.264-268, 1999.
- DAÍ, F.; FENG, D.; CAO, Q. et al. Developmental differences in carcass, meat quality and muscle fibre characteristics between the Landrace and a Chinese native pig. **South African journal of Animal science**, v.39, n.4, 2009.
- DE VRIES, A.G.; FAUCITANO, L.; SOSNICKI, A. et al. The use of gene technology for optimal development of pork meat quality. **Food Chemistry**., v.69, p.397, 2000.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634-640, 2006.
- FARIA D. A.; PEIXOTO, J. O.; LOPES, P. S. et al. Association between insulin-like growth factor I microsatellite polymorphisms and important economic traits in pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.265-270, 2009.
- GELDERMANN H.; PIEPER, U.; WEBER, W.E. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. **Journal Animal Science**, v.63, p.1759-68, 1986.
- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp. Haematol.**, v.30, p.503-12, 2002.
- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, n.15, p.27-28, 2001.
- HALEY, C. Advances in quantitative trait locus mapping, IN: CONFERENCE PROCEEDINGS: From J L Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics , 1999, p. 47–59.
- ISRAEL, C.; WELLE, J.I. 2000. Effect of Misidentification on Genetic Gain and Estimation of Breeding Value in Dairy Cattle Populations. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.1, p.181-187, 2000.
- JANSEN, R.; NAP, J.P. Genetical genomics: the added value from segregation. **Trends Genetics**, v.17, p.388–391, 2001.
- KWASIBORSKI, A.; ROCHA, D.; TERLOUW, C. Gene expression in Large White or Duroc-sired female and castrated male pigs and relationships with pork quality. **Animal Genetics**, v.40, p.852-862, 2009.



- LOBJOIS V., LIAUBET L., SANCRISTOBAL M. et al. A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. **Animal Genetics**, v.39, p.147–62, 2008.
- NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C.; STUR, I. et al. DNA microsatellite analysis for parentage control in austrian pigs. **Animal Biotechnology**, v.2, p.141 – 144, 2001.
- PAIXÃO, D. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; SILVA FILHO, M.I. et al. Detecção de Locus de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 e 18 para características de desempenho em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1781-1787, 2008.
- PAIXÃO, D. M., SILVA FILHO, M. I., PEREIRA, M. S. et al. Detection of quantitative trait loci on chromosomes 16, 17 and 18 for carcass, internal organs and meat quality traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.898-901, 2008.
- PEIXOTO, J. O., FARIA, D. A., SILVA, P. V. et al. Association between leptin gene single nucleotide polymorphisms and Carcass Traits in Pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.271-276, 2009.
- PINTO, A.P.G.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, M.S. et al. Análises de Locus Microsatélite para Detecção de QTL nos Cromossomos Nove, Dez e Onze de Suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1., 2008 Lavras. **Anais...Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras/Gmosis, [2008]. (CD-ROM)**.
- PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, C. T. et al. Mapping quantitative trait loci for performance traits on pig chromosome 6 (SSC6). **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.15, p.25-32, 2007.
- PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F. et al. Mapeamento de locos de características quantitativas associados à composição de carcaça, no cromossomo 6 de suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.725-732, 2008a.
- PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F. et al. Mapeamento de locos de características quantitativas, no cromossomo seis suíno, associados às características de cortes de carcaça. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.725-732, 2008b.
- PONSUKSILI, S.; JONAS, E.; MURANI, E. et al. Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. **BMC Genomics**, v.9, p.367, 2008.
- PUTNOVÁ, L., KNOLL, A., DVOŘÁK, V. et al. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. **Czech. Journal Animal. Science**, v.48, n.8, p.307–314, 2003.
- ROHRER, G.A.; FREKING, B.A.; NONNEMAN, D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. **Animal Genetics**, n.38, v.3, p.253-258, 2007.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M. et al. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implications for Genetic Improvement. **Journal Dairy Science**, v.79, p.676-68, 1996.
- SCHEFE, J.H., LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. **Journal of Molecular**, v.84, p.901-910, 2006.

- SEATON, G.; HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. et al. QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v.18, n.2, p.339-340, 2002.
- SERÃO, N., VERONEZE, R., RIBEIRO, A. et al. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Animal Breeding and Genetics**, JABG;09;0151.R2, 2010. (aprovado)
- SHCWARZ, S.; PRESUHN, U.; KALM, E.; et al. Characterizing polymorphism and multiplex feasibility of 142 microsatellite markers from a commercial German Landrace line. **Archieve of Tierzucht**, v.48, p.490-493, 2005.
- SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E.F. et al. Utilização de marcadores genéticos em suínos. II. Características de desempenho e de qualidade da carne. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.1, p. 11-20, 2003a.
- SILVA, K.M., PAIXÃO, D.M., SILVA, P.V. et al. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.475-480, 2008.
- SILVA, K.M. , GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. (2009). Mapeamento de Locos de Características Quantitativas para Desempenho no Cromossomo 4 de suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 474-479, 2009.
- SILVA, P.V.; GUIMARAES, S.E.F.; GUIMARÃES, J. D. et al. Expression Pattern Of P53 mRNA during the dstrous dycle in: swine. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 282-283, 2010.
- SILVEIRA, P.R.S.; CESCNETO, R.J.; ZANELLA, E.L. et al. Identificação de paternidade para avaliação da contribuição da primeira e segunda doses inseminantes na composição da leitegada suína. . **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.609-615, 2008.
- SOUZA, K.R.S.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, M.S. et al. Análise e uso de microssatélites na construção do mapa de ligação do cromossomo sete de uma população de suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA,1.,2008 Lavras. **Anais...**Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras/Gmosis, [2008]. (CD-ROM).
- SOUZA, K.R.S.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, M.S. et al. Utilização dos marcadores microssatélites na construção do mapa de ligação do cromossomo oito de uma população de suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA,1.,2008 Lavras. **Anais...**Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras/Gmosis, [2008]. (CD-ROM).
- SOUZA, K.R.S.; FROSSARD RIBEIRO, A.M.; NUNES GOES, P. R. et al.[2010]. Toll-Like receptor 6 differential expression in two pig genetic groups vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Internacional Symposium on Animal Genomics for animal health**. Disponível em: <<https://colloque.inra.fr/var/agah2010/storage/fckeditor/file/abstract-book-web2.pdf>> Acesso em: 20/07/2010.
- TANG, R.; YU, B.; ZHANG, K. et al. Effects of nutritional level on pork quality and gene expression of  $\mu$ -calpain and calpastatin in muscle of finishing pigs. **Meat Science**, v.85, p.768-771, 2010.
- TERRA,N.N.; FRIES,L.L.M. A qualidade da carne suína e sua industrialização. IN:CONFERÊNCIA VIRTUAL INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA,2000.
- VAN VLECK, L. D. Misidentification in Estimating the Paternal Sib Correlation. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.10, p.1469-1474,1970.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation.  
**BioTechniques**, v.39, p.75-85, 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)