

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO ENTRE
POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA COM MACIEZ DA
CARNE E ESPESSURA DE GORDURA EM BOVINOS
NELORE UTILIZANDO PAINÉIS DE ALTA DENSIDADE**

Rafael Espigolan
Zootecnista

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO ENTRE
POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA COM MACIEZ DA
CARNE E ESPESSURA DE GORDURA EM BOVINOS
NELORE UTILIZANDO PAINÉIS DE ALTA DENSIDADE**

Rafael Espigolan

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Sebastián Baldi Rey

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento Animal**

Espigolan, Rafael
E77d Desequilíbrio de ligação e associação entre polimorfismos de base
única com maciez da carne e espessura de gordura em bovinos
Nelore utilizando painéis de alta densidade / Rafael Espigolan. --
Jaboticabal, 2013
v, 47 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Lucia Galvão de Albuquerque
Banca examinadora: Danísio Prado Munari, Simone Cristina Méo
Niciura
Bibliografia

1. Associação genômica. 2. Bovinos de corte. 3. Características de
carcaça. 4. Manhattan plot. 5. *SNP*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rafael Espigolan, nascido em Orlândia - SP, no dia 29 de maio de 1988, filho de Alcides Espigolan e Maria Dolores Danielli Espigolan. Zootecnista formado pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal. Durante o período de graduação, foi bolsista FAPESP, sob orientação da Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque. Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da mesma faculdade, inicialmente como bolsista CAPES e posteriormente FAPESP, sob orientação da Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque.

“Let's swim to the moon,
let's climb through the tide.
Penetrate the
evening that the
city sleeps to hide.
Let's swim out tonight love,
it's our time to try.
Park besides the ocean,
on our moonlight drive.”

The Doors

Aos meus queridos pais,

Alcides e Maria Dolores.

Dedico.

À minha alma gêmea Bárbara

pelos incontáveis momentos de amor e alegria em minha vida.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lucia Galvão de Albuquerque, pela oportunidade, apoio, confiança e ensinamentos que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho e para meu amadurecimento intelectual.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fernando Baldi pela paciência e amizade, além da constante disposição em ajudar e auxiliar no meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores Dr. Luis Artur Loyola Chardulo (Capado), Dr. Danísio Prado Munari (meu conterrâneo), Dr. Humberto Tonhati e Dra. Simone Cristina Méo Niciura pelas sugestões valiosas que contribuíram para a melhor qualidade da dissertação final.

Aos meus valiosos amigos Rafael Tonussi, Daniel Gordo, Inaê, Ana Fabrícia, Larissa, Lu, Dani, Arione, Fabio, Fabielli (Puts), Jessica (Perdida) pelo carinho e amizade durante esses dois anos do mestrado, que foram inesquecíveis. A todos os outros colegas e companheiros da “salinha” e da faculdade por fazerem parte de minha formação e pelo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características de Carcaça e Qualidade da Carne.....	3
2.2 Desequilíbrio de Ligação (DL).....	4
2.3 Associação Genômica Ampla (GWAS).....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Desequilíbrio de Ligação.....	15
4.2 Associação Genômica Ampla.....	26
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA COM MACIEZ DA CARNE E ESPESSURA DE GORDURA EM BOVINOS NELORE UTILIZANDO PAINÉIS DE ALTA DENSIDADE

RESUMO – A carne produzida no Brasil a partir de raças zebuínas possui características organolépticas que não são bem aceitas nos mercados mais exigentes. As características de carcaça e da carne, como a maciez e a espessura de gordura subcutânea podem garantir qualidade e uniformidade na produção de carne bovina, porém o melhoramento genético para essas características não tem sido praticado. Os objetivos deste estudo foram analisar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos de base única (SNPs), e estudar a associação destes com a maciez da carne e espessura de gordura subcutânea no genoma de bovinos da raça Nelore utilizando um painel de SNPs de alta densidade. Foram utilizados 795 machos da raça Nelore nascidos em 2008 e 2009 e pertencentes a três programas de melhoramento genético. Um total de 117 grupos de contemporâneos foi formado, constituídos por ano de nascimento, fazenda, grupos de manejo ao nascimento, grupos de manejo à desmama e ao sobreano. Os animais foram genotipados utilizando o Illumina High-Density Bovine BeadChip com 777.962 marcadores SNPs. O DNA genômico foi extraído utilizando amostras de cinco gramas de tecido muscular retirados do *Longissimus dorsi* de cada animal. Foram excluídos SNPs que apresentaram MAF (alelo de menor frequência) inferior a 0,05 e *Call Rate* menor que 0,93, totalizando 446.986 SNPs. Os fenótipos para maciez da carne foram obtidos utilizando um equipamento de análise de textura equipado com uma sonda *Warner Bratzler* em amostras de 2,54 cm retiradas entre a 12ª e 13ª costelas da meia-carcaça esquerda. Na mesma amostra foi mensurada a espessura de gordura subcutânea com paquímetro, medindo a camada de gordura localizada a um ângulo de 45º a partir do centro geométrico. As análises de associação foram realizadas considerando apenas um marcador por vez. Os efeitos fixos considerados no modelo foram marcador SNP, grupo de contemporâneos, data de abate e idade de abate como covariável. Para a estimação do efeito de cada SNP sobre as características, o marcador SNP foi incluído como covariável no modelo (efeito linear). A média de desequilíbrio de ligação (r^2) para todos os autossomos foi de 0,17, a uma distância média de $4,90 \pm 2,89$ kb, e a média da MAF foi de $0,25 \pm 0,13$. O r^2 diminuiu com o aumento da distância entre os marcadores. Níveis moderados de r^2 (entre 0,20 e 0,34) foram encontrados a distâncias menores que 30 kb e menores níveis (entre 0,20 e 0,11) foram observados de 30 a 100 kb. Os cromossomos 13, 12 e 11 apresentaram, respectivamente, 105, 48 e 48 marcadores SNPs significativos ($p < 0,001$) para maciez da carne. Para espessura de gordura foram encontrados 68, 38 e 35 SNPs significativos ($p < 0,001$), localizados, respectivamente, nos cromossomos 7, 8 e 10. Não foram encontrados na literatura trabalhos em que tenham sido observados QTL associados à maciez da carne e espessura de gordura subcutânea nos cromossomos 13 e 10, respectivamente.

Palavras-chave: associação genômica, bovinos de corte, características de carcaça, manhattan plot, SNP

LINKAGE DISEQUILIBRIUM AND ASSOCIATION BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS WITH MEAT TENDERNESS AND FAT THICKNESS IN NELLORE CATTLE USING HIGH DENSITY PANELS

ABSTRACT - The meat produced in Brazil from Zebu breeds has organoleptic characteristics that are not well accepted in the most demanding markets. Carcass and meat traits, like tenderness and fat thickness, can ensure quality and uniformity in beef production, but genetic improvement for these traits has not been practiced. The objective of this study was analyze the linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms (SNPs), and to study their association with the tenderness of meat and fat thickness in the genome of Nellore cattle using a panel of high-density SNPs. Data from 795 Nellore cattle born in 2008 and 2009 and belonging to three breeding programs were used. A total of 117 contemporary groups were formed, constituted of year of birth, farm, management groups at birth, management groups at weaning and yearling. The animals were genotyped using Illumina High-Density Bovine BeadChip with 777,962 SNP markers. Genomic DNA was extracted with samples from five grams of tissue taken from the *Longissimus dorsi* muscle of each animal. SNPs that had MAF less than 0.05 and Call Rate less than 0.93 were excluded, totaling 446,986 SNPs. The phenotypes for meat tenderness were obtained using a texture analysis equipment equipped with a Warner Bratzler probe in samples of 2.54 cm taken between the 12th and 13th ribs of the left half carcass. On the same sample, it was measured the thickness of subcutaneous fat with caliper rule, measuring the fat located at an angle of 45° from the geometric center. The association analysis was performed considering only one marker at a time. The fixed effects in the model were SNP marker, contemporary group, date of slaughter and slaughter age as covariate. To estimate the effect of each SNP over the traits, the SNP marker was included as a covariate (linear effect). The average linkage disequilibrium (r^2) for all autosomes was 0.17, the average distance of 4.90 ± 2.89 kb, and the average MAF was 0.25 ± 0.13 . The r^2 decreased with increasing distance between the markers. Moderate r^2 levels (between 0.20 and 0.34) were found at distances smaller than 30 kb and lower levels (between 0.20 and 0.11) were observed 30-100 kb. Chromosomes 13, 12 and 11 was, respectively, 105, 48 and 48 significant SNPs markers ($p < 0.001$) for meat tenderness. For fat thickness, 68, 38 and 35 significant SNPs ($p < 0.001$) were found, located respectively on chromosomes 7, 8 and 10. It was not found any studies that have observed QTL associated with meat tenderness and fat thickness on chromosomes 13 and 10, respectively.

Keywords: genomic association, beef cattle, carcass traits, manhattan plot, SNP

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de marcadores SNPs excluídos (N) para cada critério de exclusão.....	10
Tabela 2. Estatísticas descritivas para as características de maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.....	13
Tabela 3. Resumo dos marcadores SNP analisados e desequilíbrio de ligação (r^2 e $ D' $) entre marcadores para cada autossomo bovino (BTA).....	16
Tabela 4. Desequilíbrio de ligação (r^2 e $ D' $) entre pares (N) de SNPs para várias distâncias considerando todos os autossomos.....	19
Tabela 5. Número de marcadores SNPs significativos ($p < 0,001$) por cromossomo para a maciez da carne e a espessura de gordura subcutânea.....	31
Tabela 6. Efeito, polimorfismos e frequências dos marcadores SNPs mais significativos para a maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.....	37
Tabela 7. Distâncias entre genes e marcadores SNPs mais significativos ($p < 0,001$) para maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proporções médias de SNPs para vários intervalos de MAF por cromossomo bovino (BTA).....	17
Figura 2. Valores médios de r^2 por cromossomo em função da distância entre marcadores.....	20
Figura 3. Valores médios de $ D' $ por cromossomo em função da distância entre marcadores SNPs.....	21
Figura 4. Estimativas médias de r^2 para diferentes limiares de MAF em função da distância entre marcadores SNPs.....	23
Figura 5. Estimativas médias de $ D' $ para diferentes limiares de MAF em função da distância entre marcadores.....	24
Figura 6. Manhattan plot dos resultados da associação genômica para maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Valores acima de $-\log P > 3$ são equivalentes a $p < 0,001$	27
Figura 7. Manhattan plot dos resultados da associação genômica para espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Nelore. Valores acima de $-\log P > 3$ são equivalentes a $p < 0,001$	28
Figura 8. Gráfico quantil-quantil da distribuição dos valores observados para o estudo de associação genômica da maciez da carne comparado com a distribuição normal.....	30
Figura 9. Gráfico quantil-quantil da distribuição dos valores observados para o estudo de associação genômica da espessura de gordura subcutânea comparado com a distribuição normal.....	30
Figura 10. Manhattan plot dos efeitos (absolutos) para cada marcador SNP em função dos cromossomos para a maciez da carne.....	35
Figura 11. Manhattan plot dos efeitos (absolutos) para cada marcador SNP em função dos cromossomos para a espessura de gordura subcutânea.....	36

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é de, aproximadamente, 180 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2012). Dados de 2011 relatam que foram abatidos pouco mais de 38 milhões de animais, produzindo 7,5 milhões de toneladas de equivalente-carcaça, sendo que mais de 1 milhão de toneladas foram exportadas (ABIEC, 2012).

A partir do fim da década de 80 e início dos anos 90, ocorreu o desenvolvimento de uma série de programas destinados à avaliação genética, despertando um crescente interesse em utilizar animais geneticamente avaliados na população Zebu. Existem vários programas de avaliação genética para raças zebuínas, principalmente Nelore, os quais utilizam, como critério de seleção, prioritariamente características de crescimento e conformação (YOKOO et al, 2007).

Atualmente, o valor genético dos animais pode ser obtido a partir de dados genômicos, por meio da seleção assistida por marcadores considerando todo o genoma (MEUWISSEN et al. 2001, BENNEWITZ et al., 2009; CALUS et al., 2009). Porém, os conceitos teóricos e os meios para identificar genes relacionados a características complexas datam da década de 90 (ZHANG et al. 2012a). O mapeamento de locos de características quantitativas (QTL) foi a abordagem preferida para detectar variações genéticas em características economicamente importantes. No entanto, a maioria dos QTL relatados foram detectados utilizando marcadores microssatélites com baixa resolução do mapeamento genético e um intervalo de confiança cobrindo mais do que 20.000 kb (SOLLER et al., 2006) ou mesmo um cromossomo inteiro (SCHREIWEIS et al., 2005). Portanto, é difícil identificar os genes importantes para características de interesse baseados nessa informação.

Uma estratégia para a identificação e mapeamento de QTL é a utilização do desequilíbrio de ligação (DL) na população, a partir da associação (ligação) existente entre o marcador genético e o QTL (GODDARD, 1991). Esta associação é consequência da proximidade física que existe entre ambos (ARDLIE, KRUGLYAK e SEIELSTAD, 2002). Quantificar o nível do desequilíbrio de ligação é um importante passo para o mapeamento fino de QTL e seleção genômica (MEUWISSEN e GODDARD, 2000) e proporcionar melhor entendimento da arquitetura genômica e

da estrutura histórica da população (HAYES et al., 2009). Assim, o sucesso do mapeamento das regiões em DL depende de um balanço apropriado entre a extensão deste desequilíbrio e a densidade de marcadores (SARGOLZAEI et al., 2008).

A associação genômica ampla (GWAS) é uma nova técnica empregada na identificação de genes causais para características de importância na pecuária. No GWAS utilizam-se variações existentes (principalmente polimorfismos de base única, SNPs) em todo o genoma, em conjunto com o fenótipo e informações de pedigree, para realizar uma análise de associação e, desse modo, identificar genes que são importantes para características de interesse (ZHANG et al. 2012a). Em comparação com as tradicionais estratégias de mapeamento de QTL, a GWAS confere vantagens importantes, tanto no poder para detectar variantes causais com efeitos modestos quanto na definição de regiões genômicas que abrigam estas variações (HIRSCHHORN e DALY, 2005).

Poucos programas de melhoramento genético disponibilizam avaliações genéticas para as características de carcaça e indicadoras da qualidade da carne. Características como maciez da carne e espessura de gordura subcutânea são de expressão tardia e, para sua obtenção, exigem o abate dos animais, além de possuírem alto custo de mensuração. A informação molecular, obtida a partir da análise do desequilíbrio de ligação e de estudos da associação dos polimorfismos de base única com as características de interesse, permitirá a avaliação genética de animais jovens para as mesmas.

Neste estudo, os objetivos foram analisar o desequilíbrio de ligação entre marcadores do tipo SNP e estudar a associação destes com a maciez da carne e espessura de gordura subcutânea no genoma de bovinos da raça Nelore, visando trazer informações importantes para a avaliação genética de animais para estas características.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características de Carcaça e Qualidade da Carne

Segundo Cundiff et al. (1993) uma carcaça de qualidade deve apresentar quantidade de gordura suficiente para garantir sua preservação e características desejáveis para o consumo. Para a maioria dos consumidores de carne, a maciez é o atributo sensorial com a maior influência na satisfação (HUFFMAN et al., 1996, DEVITT et al., 2002). A partir de uma pesquisa de mercado demonstrou-se que ao melhorar a maciez da carne ocorre aumento tanto da probabilidade dos consumidores comprarem carne quanto do preço que esses estão dispostos a pagar (BOLEMAN et al., 1997; PLATTER et al., 2003). Nos mercados com maiores exigências em termos de qualidade de produto, mas que também valorizam o preço dos cortes cárneos, a falta de maciez tem sido identificada como a maior causa da insatisfação do consumidor (KOOHMARAIE et al., 2002).

A espessura de gordura subcutânea vem sendo enfatizada como importante indicador da qualidade final da carne, uma vez que afeta a velocidade de resfriamento da carcaça, funcionando como um isolante térmico e interferindo, positivamente, na conversão de músculo em carne para o consumo humano (FELÍCIO, 1997). Tatum et al. (1999) identificaram a ação do *post-mortem* como ponto crítico para problemas na maciez da carne. No entanto, os autores sugerem que o amaciamento *post-mortem* pode ser influenciado por fatores genéticos, ligados ao sexo e a cobertura de gordura da carcaça (espessura de gordura subcutânea).

Apesar das raças zebuínas demonstrarem maior adaptação ao meio e resistência a parasitas, produzem carcaças com menor proporção de gordura, menor maciez da carne e menor percentagem de gordura intramuscular que os *Bos taurus* (CUNDIFF, 2004). Segundo Koohmaraie et al. (2002), quatro marcadores genéticos para a maciez da carne estão localizados no complexo enzimático da calpaína-calpastatina. Este complexo regula a taxa de degradação da proteína no animal vivo. A atividade de calpaínas acelera a degradação de proteínas enquanto que a atividade de calpastatina, que é muito mais intensa em *Bos indicus*, atua como

um inibidor dessa degradação. Buainain e Batalha (2007) ressaltam que esforços devem ser dirigidos para incentivar o crescimento da cadeia produtiva de carne bovina brasileira, não apenas quantitativamente, mas também da qualidade do produto ofertado.

A maciez da carne e a espessura de gordura subcutânea são difíceis de mensurar, uma vez que a primeira exige o abate dos animais e a segunda é de expressão tardia. Portanto, existe dificuldade em encontrar animais jovens avaliados para essas características.

2.2 Desequilíbrio de Ligação (DL)

Os primeiros trabalhos para desenvolver e caracterizar marcadores moleculares para espécies de interesse zootécnico datam do início dos anos 80 (CAETANO, 2009). Trabalhos com suínos (CHARDON et al., 1985) e bovinos (BECKMAMM et al., 1986) relatam resultados com marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Porém, esses apresentam algumas desvantagens como a grande quantidade de DNA puro e de alto peso molecular (BECKMAMM et al., 1986). De acordo com Vignal et al. (2002) os marcadores genéticos de DNA podem ser classificados, em função do tipo de informação que fornecem em um único locus, em três categorias principais, com graus crescente de interesse: os bi alélicos dominantes, tais como os RAPDs (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e AFLPs (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados); bi alélicos codominantes, como RFLPs (fragmentos de DNA de comprimento polimórfico) e SSCP (polimorfismos de conformação de fita simples) e os multialélicos codominantes, como os microssatélites.

O sequenciamento de fragmentos específicos de DNA possibilitou a detecção de polimorfismos do tipo SNP (ORITA et al., 1989). A principal vantagem da utilização de marcadores SNPs é o potencial para rendimento automatizado elevado, tornando o custo das análises moderado (CHEN e SULLIVAN, 2003). Outras vantagens do uso de marcadores do tipo SNP é a baixa taxa de mutação e a abundância dos polimorfismos no genoma de espécies não endogâmicas (SCHLÖTTERER, 2004).

Nas últimas décadas, têm sido identificados vários loci chamados de QTL (quantitative trait loci ou locos de características quantitativas) que afetam ou influenciam características de importância econômica. Estes QTL explicam uma determinada fração da variação fenotípica das características quantitativas (ANDERSON, 2001; BARTOM e KEIGHTLEY, 2002).

A utilização do desequilíbrio de ligação (DL) existente na população é uma das estratégias para a identificação e mapeamento dos QTL. Isso ocorre porque existe uma associação (ligação) entre o marcador genético e o QTL (GODDARD, 1991). Esta associação ou ligação é consequência da proximidade física existente entre ambos (ARDLIE; KRUGLYAK; SEIELSTAD, 2002; BOLORMAA et al., 2011a).

Em populações de bovinos com tamanho efetivo pequeno, um nível de DL substancial deverá abranger grandes distâncias genéticas (FARNIR et al., 2000; McRAE et al., 2002; ODANI et al., 2006). Portanto, a densidade dos marcadores deve ser suficientemente alta para garantir que todos os QTL estejam em DL com um marcador ou haplótipo de marcadores.

Os mapas de DL são uma ferramenta fundamental para explorar a base genética de características economicamente importantes. Mapas comparativos de DL permitem explorar o grau de diversidade entre raças de bovinos que apresentam diferentes atributos biológicos e detectar regiões genômicas que foram sujeitas a diferentes pressões seletivas (MCKAY et al., 2007).

As duas medidas mais comumente usadas para avaliar o DL para marcadores bi-alélicos são r^2 e $|D'|$ (HILL e ROBERTSON, 1968; HILL, 1981; VALDAR et al. 2006, BOHMANOVA et al., 2010). Estes parâmetros podem variar entre 0 e 1. Um $|D'| < 1$ indica que ocorreu recombinação entre dois loci e um $|D'| = 1$ indica falta de recombinação entre os dois loci, desde a ocorrência do polimorfismo. Uma desvantagem do $|D'|$ é que este tende a ser fortemente inflacionado em pequenas amostras e na presença de um alelo raro ou em baixa frequência. O r^2 representa a correlação entre dois loci, e é preferido para estudos de associação, porque existe uma relação inversa entre o r^2 e o tamanho da amostra que é necessário para detectar a associação entre um QTL e um marcador (PRITCHARD, 2001).

O desequilíbrio de ligação entre os marcadores tem sido amplamente estudado no genoma de raças taurinas. Marques et al. (2008), analisando 505 SNPs

no cromossomo 14 na raça Holandesa, relataram níveis moderados de LD ($r^2 = 0,20$) para distâncias entre marcadores espaçados até 100 kb. Resultados semelhantes foram obtidos por McKay et al. (2007) que estimaram o LD (r^2) entre 2.670 marcadores para oito raças bovinas. Sargolzaei et al. (2008) genotiparam 497 touros da raça Holandesa, utilizando para isso um chip de 10K, e analisaram 5.564 SNPs encontrando níveis de LD com r^2 maior que 0,30 em distâncias menores que 100 kb. Villa-Angulo et al. (2009) estudaram o genoma de 19 raças (taurinas e zebuínas) utilizando um conjunto de 32.826 marcadores SNPs. Os autores relataram que as raças zebuínas tem uma proporção superior de alelos de menor frequência (MAF) e um nível de LD menor em relação às raças taurinas. Silva et al. (2010) genotiparam 25 touros da raça Gir com um painel de 54.000 marcadores (SNPs) e obtiveram uma média de LD (r^2) entre os marcadores adjacentes de cerca de 0,21.

2.3 Associação Genômica Ampla (GWAS)

Segundo Daetwyler et al. (2008) o número limitado de marcadores e o alto custo da genotipagem dificultavam os estudos de associação com marcadores genéticos. Assim, apenas uma proporção pequena da variação genética total era identificada pelos marcadores, prejudicando o ganho genético para características de interesse econômico (SOLBERG et al., 2008).

Zhang et al. (2012a) relatam que a associação genômica foi usada pela primeira vez na análise de doenças humanas e tornou-se viável em animais domésticos como resultado do desenvolvimento de grandes coleções de SNPs e viabilização de métodos de análise de SNPs com custos moderados. Comparada às estratégias tradicionais de mapeamento de QTL, a associação genômica confere vantagens tanto para detectar variantes causais com efeitos modestos quanto para definição de regiões genômicas que abrigam essas variações (HIRSCHHORN e DALY, 2005).

Uma suposição feita nas análises de GWAS é que associações significativas podem ser detectadas porque os SNPs estão em desequilíbrio de ligação com as mutações causais que afetam as características de interesse. A alta densidade de marcadores do tipo SNP presentes nos chips utilizados para a associação genômica

é suficiente para identificar o DL entre os marcadores e as mutações causais (GODDARD, 1991).

Existem vários tipos comerciais de chips, com marcadores SNP, disponíveis para bovinos (50.000 SNPs; Illumina BovineSNP50 BeadChip), cães (22.362 SNPs; Illumina CanineSNP20 BeadChip), ovinos (56.000 SNPs), suínos (60.000 SNPs; Illumina PorcineSNP60 BeadChip), equinos (54.602 SNPs; Illumina EquineSNP50 BeadChip) e galinhas (60.000 SNPs; Illumina ChickenSNP60 BeadChip) (ILLUMINA, 2013).

Em janeiro de 2010, a empresa Illumina® lançou o High-Density Bovine BeadChip, um painel com 777.962 marcadores do tipo SNP, dos quais cerca de 453.361 (58%) estão validados para animais da raça Nelore (ILLUMINA, 2013). Durante os últimos anos, foram relatados vários exemplos que descrevem a utilização da associação genômica para diversas características economicamente importantes em bovinos, incluindo características de carcaça e qualidade da carne (ZHANG et al., 2012a).

Em diversos trabalhos foram descritas associações pontuais de alguns poucos genes com as características de carcaça e da qualidade da carne. No trabalho realizado por Schenkel et al. (2006) foram encontradas associações entre quatro SNPs localizados no gene da leptina com o depósito de gordura subcutânea e rendimento de gordura. Gill et al. (2009) avaliaram o efeito de 8 SNPs sobre a maciez da carne, gordura de cobertura, composição de carcaça e produção/qualidade de leite na raça Aberdeen Angus. Estes autores observaram associações significativas entre o SNP CAPN31, localizado no gene da Calpaína, com a maciez medida de formas objetiva (*shear force*) e subjetiva (avaliação sensorial) da carne.

Trabalhando com a associação de um marcador SNP na região do gene IGF1, Islam et al. (2009) utilizaram dados fenotípicos de dez características de carcaça e de deposição de gordura, em 204 bovinos da raça Angus, 186 da raça Charolês e 455 híbridos. Os autores encontraram associações estatisticamente significativas para as características de espessura de gordura determinada por ultrassom ($p=0,030$), gordura média da carcaça ($p=0,015$) e rendimento de carne na carcaça ($p=0,023$). Cafe et al. (2010) avaliaram a magnitude e os efeitos de 4

marcadores para maciez da carne (CAST, CAPN3, CAPN1 e CAPN1-316), utilizando 82 novilhas e 82 machos castrados da raça Brahman e concluíram que a seleção baseada nos marcadores para CAST e CAPN3 pode melhorar a maciez da carne em bovinos dessa raça. Zhang et al. (2012b) trabalharam com 182 genes associados a seis características de carcaça (espessura de gordura, marmorização, peso da carcaça quente, área de olho de lombo, *quality grade* e *yield grade* ajustado) e 24 ácidos graxos em 791 bovinos $\frac{1}{2}$ Wagyu $\frac{1}{2}$ Angus. Do total de marcadores SNPs avaliados, 113 apresentaram associação significativa ($p < 0,05$) com as características relatadas.

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos de associação de SNP com características de carcaça e carne. Ferraz et al. (2009) associaram dois marcadores genéticos do tipo SNP (T945M e UCP1SNP1), considerando ou não os efeitos dos poligenes, com medidas fenotípicas de espessura de gordura, área de olho de lombo e peso da carcaça quente de 638 bovinos da raça Nelore. Os autores reportaram que quando o efeito dos poligenes não foi considerado no modelo, os dois SNPs apresentaram associações significativas com todas as características avaliadas. Entretanto, quando o efeito dos poligenes foi incluído no modelo, apenas o SNP T945M esteve associado significativamente ($p < 0,05$) com a área de olho de lombo.

Mais recentemente, com a automatização da identificação de SNP, um número maior de marcadores pode ser identificado para um grande número de animais, a um custo acessível. Assim Nalaila et al. (2011), trabalhando com dados de 418 híbridos (Angus x Charolês) e utilizando 1207 marcadores do tipo SNP cobrindo todo o genoma, identificaram 105 QTL ($p < 0,05$) para 16 características de carcaça medidas por ultrassom, entre elas, espessura de gordura, marmorização e área de olho de lombo.

Trabalhos de associação genômica ampla, com várias características, utilizando o painel da Illumina Bovine SNP50 Beadchip (56,947 SNPs) têm sido publicados. Snelling et al. (2010), genotiparam 1896 novilhos e 707 fêmeas que representavam 7 raças (Angus, Charolês, Gelbvieh, Hereford, Limousin, Red Angus e Simental). Os autores analisaram características de crescimento e descobriram 12.425 SNPs estatisticamente significativos ($p < 0,01$). Em trabalho de Bolormaa et al.

(2011a), foram estudadas associações genômicas para consumo alimentar residual, peso corporal e altura da garupa em três grupos genéticos (*Bos indicus*, *Bos taurus*, e *B. indicus* x *B. taurus*), além da estatura em vacas leiteiras, usando os dados de genótipos dos SNP obtidos com chips de 10K e 50K. Foram encontrados 75 marcadores do tipo SNP significativos ($p < 0,001$) para consumo alimentar residual, 176 marcadores para peso corporal e 198 SNPs para altura da garupa, em todas as raças. Alam et al. (2011) genotiparam 497 novilhos da raça Hanwoo empregando o painel de SNPs com 50.000 marcadores. Os dados fenotípicos eram de características de conformação corporal. Um conjunto de 35.987 SNPs foi selecionado, e destes, 72 estavam associados ($p < 0,001$) às características de conformação, explicando até 26% da variação fenotípica total.

Ainda são poucos os trabalhos de associação genômica ampla com características de carne ou carcaça. Miller et al. (2010), trabalhando com 702 animais das raças Angus, Charolês, Simental e Piemontês, estudaram a associação entre 56.947 marcadores SNPs com a maciez da carne. Os autores encontraram 1.964 e 466 marcadores SNPs associados com a maciez da carne a um nível de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. Bolormaa et al. (2011b), com o objetivo de identificar SNPs associados com a maciez da carne e a espessura de gordura na região da garupa (picanha), utilizaram DNA de 940 bovinos de diferentes raças (Angus, Hereford, Murray Grey, Shorthorn, Brahman) que foram genotipados com chip de 53.798 SNP. Destes SNPs, os autores encontraram 64 associados com a maciez da carne e 63 com a espessura de gordura na garupa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo do desequilíbrio de ligação foi utilizado um total de 795 machos da raça Nelore, nascidos em 2008 e 2009, filhos de 117 touros e pertencentes a três programas de melhoramento genético. O DNA foi extraído de cerca de cinco gramas de tecido muscular correspondente ao músculo *Logissimus dorsi* e acondicionado em tubo eppendorf de 2 ml identificado com o número do animal e armazenado em freezer à -20°C. Foram pesados pedaços de tecidos muscular variando de 25 a 30 mg sob folha de alumínio em balança analítica, os quais, posteriormente, foram colocados em tubos eppendorf (1,5 – 2 ml). A extração do DNA foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue Kit da Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segundo instruções do fabricante. A genotipagem foi realizada no Departamento de Tecnologia (UNESP, Câmpus de Jaboticabal) utilizando-se o painel BovineHD BeadChip de alta densidade, segundo protocolo da Illumina, com o aparelho HiScan™SQ System. O Bovine HD BeadChip contém 777.962 marcadores do tipo SNP espalhados pelo genoma com uma distância média entre marcadores de 3,43 kb. O software GenomeStudio (Illumina®) foi utilizado para analisar as imagens do HiScan e obtenção dos genótipos.

O controle de qualidade dos dados e a preparação dos genótipos foram realizados no prompt de comando do UNIX, presente no sistema operacional Fedora. Os genótipos foram definidos como 0 (AA), 1 (AB) e 2 (BB), e os não identificados como 5. Os critérios de exclusão utilizados para o controle de qualidade dos dados da genotipagem são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de marcadores SNPs excluídos (N) para cada critério de exclusão.

Critérios de exclusão	N
MAF < 0,05	279.991
Heterozigose > 0,30	851
Call Freq < 0,93	7.335
Intensidade média do <i>cluster</i> > 0,30	12.630
Remoção dos cromossomos sexuais	23.766
Remoção de marcadores com baixa frequência A/B	6.403

A MAF (*Minor Allele Frequency*) representa a frequência em que o alelo menos abundante está presente em determinada população. O critério *Call Freq* ou *Call Rate* é definido como a taxa de atribuição de genótipos, e representa a eficiência da genotipagem para cada marcador SNP. Com a finalidade de evitar possíveis erros de genotipagem, SNPs com excesso de heterozigose e de homozigose foram excluídos. Os intervalos de confiança gerados com base na população analisada são chamados de *clusters*. SNPs distantes desses intervalos não foram considerados. Desse modo, restaram 446.986 marcadores disponíveis para a determinação do DL e da associação genômica.

O desequilíbrio de ligação entre dois SNPs foi avaliado utilizando o r^2 e o valor absoluto de D' . O r^2 pode ser calculado da seguinte forma:

$$r^2 = \frac{(freq.AB * freq.ab - freq.Ab * freq.aB)^2}{(freq.A * freq.a * freq.B * freq.b)} = \frac{(D)^2}{(freq.A * freq.a * freq.B * freq.b)}$$

Enquanto D é definido como:

$$D = freq .AB - freq .A * freq .B$$

e

$$D' = \begin{cases} \frac{D}{\min(freq.A * freq.b, freq.a * freq.B)} & \text{if } D > 0 \\ \frac{D}{\min(freq.A * freq.B, freq.a * freq.b)} & \text{if } D < 0 \end{cases}$$

em que $freq.A$, $freq.a$, $freq.B$, $freq.b$ são as frequência dos alelos A , a , B e b , respectivamente, e $freq.AB$, $freq.ab$, $freq.Ab$ e $freq.aB$, são as frequências dos haplótipos AB , ab , aB e Ab , na população, respectivamente. Se os dois loci são independentes, então a frequência esperada do haplótipo AB ($freq.AB$) é calculada como o produto entre $freq.A$ e $freq.B$. Se $freq.AB$ é maior ou menor do que o esperado, então esses dois loci em particular, tendem a segregar conjuntamente e estão em DL. As medidas de desequilíbrio de ligação (r^2 e $|D'|$) foram calculadas

para todos os pares de marcadores em cada cromossomo, utilizando o software SnppldHD.

Para os estudos de associação genômica foi utilizado um total de 740 machos da raça Nelore, filhos de 108 touros. Neste caso, além dos critérios de consistência descritos anteriormente, foram mantidos animais em grupos de contemporâneos com no mínimo três animais. Os grupos de contemporâneos (GC) foram definidos como: ano, fazenda e grupo de manejo ao nascimento, além de grupo de manejo à desmama e ao sobreano. Um total de 117 GC foi formado.

O abate dos animais ocorreu em plantas frigoríficas comerciais e as carcaças eram resfriadas por no mínimo 24 horas. Após o resfriamento, foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* com osso e espessura aproximada de 2,54 cm (uma polegada) entre a 12ª e 13ª costelas da meia-carcaça esquerda de cada animal. As amostras foram embaladas a vácuo e mantidas em câmara de resfriamento até completarem 150 horas pós-abate, sob temperatura de 1°C. Após o período de resfriamento, com estabelecimento pleno do *rigor mortis*, as amostras foram então congeladas a temperatura de -20°C. As análises físicas da carne foram realizadas no Laboratório de Qualidade e Certificação da Carne - LQCC, sediado na Central Bela Vista - Genética Bovina, Ltda. no município de Pardinho, estado de São Paulo.

Para a realização do ensaio de força de cisalhamento, as amostras foram descongeladas em câmara de resfriamento a 1°C, por cerca de 24 horas. Posteriormente, ao atingirem a temperatura interna de 5°C, foram assadas em forno preaquecido a 170°C até a temperatura de 71°C (medida com auxílio de termopar posicionado no centro geométrico da peça), segundo procedimento padronizado e proposto por Wheeler *et al.* (1995).

Na determinação da maciez objetiva da carne foi utilizado um equipamento SALTER mecânico equipado com uma sonda *Warner-Bratzler* com capacidade de 25 kg e velocidade de seccionamento de 20 cm/minuto. O *shearing* foi realizado em cilindros de ½ polegada, retirados da região central da amostra em sentido longitudinal às fibras musculares. Foram feitas seis medidas por amostra a fim de se obter maior precisão nos resultados, que foram expressos em quilogramas força (*kgf*). Na mesma amostra utilizada para a determinação da maciez da carne, foi

mensurada a espessura de gordura subcutânea utilizando paquímetro, medindo a camada de gordura localizada a um ângulo de 45° a partir do centro geométrico da amostra, e os valores dados em milímetros. As estatísticas descritivas das características analisadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Estatísticas descritivas para as características de maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.

Característica	Número de observações	Média	Máximo	Mínimo	D.P. ¹	C.V. ²
Maciez da carne (kgf)	740	4,78	11,20	2,00	1,24	25,94
Espessura de gordura subcutânea (mm)	740	5,39	23,00	1,00	3,28	60,85

¹Desvio padrão. ² Coeficiente de variação (%)

As análises de associação foram realizadas considerando apenas um marcador por vez utilizando o comando MACRO e o procedimento MIXED do programa SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., NC, USA). Os efeitos fixos considerados no modelo foram: marcador SNP, grupo de contemporâneos, data de abate (15 níveis) e idade de abate como covariável (efeito linear). Para a estimação do efeito de cada SNP sobre as características, o marcador SNP foi incluído como covariável no modelo (efeito linear). A taxa de falsos positivos (FPR) foi calculada da seguinte forma (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995):

$$\text{FPR} = (m \cdot p) / n$$

em que m é o número de marcadores testados (marcadores que passaram no controle de qualidade), p é o nível de significância e n consiste no número de marcadores significativos (nível de significância $< p$) para cada característica.

Nos estudos de associação genômica, os gráficos “quantil-quantil” conhecidos como q-q plot, são usados para diagnóstico e permitem comparar a distribuição dos testes estatísticos observados com aquela esperada sob a hipótese nula, ou seja, de que não há associação ou desequilíbrio de ligação entre os SNPs e a característica relacionada (MCCARTHY et al., 2008). Assim, os gráficos do tipo Manhattan e Quantil – Quantil (Q-Q plot) foram construídos utilizando o pacote de instruções *GAP*

do *software R* (R Development Core Team, 2012). Os níveis de significância considerados para os marcadores foram 5, 1 e 0,1%. O teste de Bonferroni ao nível de 5% também foi aplicado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desequilíbrio de Ligação

Um total de 446.986 (57,5%) marcadores atendeu aos critérios de consistência e foi incluído na análise final. Este subconjunto de marcadores cobriu 2508,4 Mb do genoma com $4,90 \pm 2,89$ kb de espaçamento médio entre marcadores (Tabela 3). Os SNPs foram uniformemente distribuídos entre os autossomos, uma vez que a densidade de marcadores foi semelhante para todos os cromossomos, variando de 4,9 a 5,2 kb (Tabela 3). Os autossomos diferiram em tamanho tal que o BTA25 (BTA: autossomo *Bos taurus*) foi o mais curto (42,8 Mb) e BTA1 foi o mais longo (158,5 Mb).

Uma proporção considerável de marcadores SNPs tinha MAF abaixo de 0,20 (Figura 1). Resultados semelhantes foram relatados por McKay et al. (2007) e Silva et al. (2010) para raças zebuínas. Entretanto, a média de MAF obtida no presente estudo (0,25), foi ligeiramente superior às relatadas para Nelore por Matukumalli et al. (2009) de 0,19 e no Illumina BovineSNP50K BeadChip (Bovine Hapmap Consortium) de 0,20 (GIBBS, et al, 2009). Os cromossomos BTA2, BTA4, BTA7, BTA15, BTA17, BTA25 e BTA26 mostraram uma maior proporção de alelos de baixa frequência (MAF<0,10). Enquanto os cromossomos BTA6, BTA8, BTA16, BTA22 e BTA23 apresentaram uma menor proporção de MAF< 0,10.

Tabela 3. Resumo dos marcadores SNP analisados e desequilíbrio de ligação (r^2 e $|D'|$) entre marcadores para cada autossomo bovino (BTA).

BTA	Tamanho (Mb)	SNP (n)	Distância Média $\pm$ SD ¹ (Kb)	Média r^2 $\pm$ SD ¹	Mediana r^2	Média $ D' $ $\pm$ SD ¹	Mediana $ D' $	Média MAF $\pm$ SD ¹
1	158,5	28.569	5,0 $\pm$ 2,9	0,12 $\pm$ 0,22	0,015	0,38 $\pm$ 0,34	0,26	0,25 $\pm$ 0,13
2	136,8	23.866	5,1 $\pm$ 2,9	0,19 $\pm$ 0,25	0,077	0,57 $\pm$ 0,32	0,60	0,25 $\pm$ 0,13
3	121,4	22.592	5,1 $\pm$ 2,9	0,19 $\pm$ 0,25	0,081	0,57 $\pm$ 0,32	0,60	0,25 $\pm$ 0,13
4	120,6	20.907	5,1 $\pm$ 2,9	0,18 $\pm$ 0,24	0,071	0,56 $\pm$ 0,32	0,59	0,25 $\pm$ 0,13
5	121,1	20.092	5,1 $\pm$ 2,9	0,20 $\pm$ 0,25	0,086	0,58 $\pm$ 0,32	0,62	0,26 $\pm$ 0,13
6	119,4	23.500	5,1 $\pm$ 2,9	0,19 $\pm$ 0,25	0,086	0,57 $\pm$ 0,32	0,62	0,27 $\pm$ 0,13
7	112,6	20.181	5,1 $\pm$ 2,9	0,20 $\pm$ 0,25	0,082	0,56 $\pm$ 0,32	0,60	0,25 $\pm$ 0,13
8	113,3	21.667	5,2 $\pm$ 2,8	0,20 $\pm$ 0,25	0,097	0,59 $\pm$ 0,32	0,64	0,26 $\pm$ 0,13
9	105,6	20.593	5,1 $\pm$ 2,9	0,19 $\pm$ 0,25	0,078	0,56 $\pm$ 0,32	0,59	0,26 $\pm$ 0,13
10	104,2	17.213	5,0 $\pm$ 2,9	0,18 $\pm$ 0,25	0,064	0,57 $\pm$ 0,32	0,55	0,25 $\pm$ 0,13
11	107,2	18.477	5,0 $\pm$ 2,9	0,19 $\pm$ 0,25	0,070	0,56 $\pm$ 0,32	0,59	0,24 $\pm$ 0,13
12	91,1	15.556	5,1 $\pm$ 2,9	0,18 $\pm$ 0,24	0,070	0,55 $\pm$ 0,32	0,57	0,24 $\pm$ 0,13
13	84,2	14.145	5,1 $\pm$ 2,9	0,21 $\pm$ 0,26	0,094	0,59 $\pm$ 0,32	0,65	0,25 $\pm$ 0,13
14	83,9	16.909	5,2 $\pm$ 2,8	0,18 $\pm$ 0,24	0,079	0,56 $\pm$ 0,32	0,59	0,26 $\pm$ 0,13
15	85,2	14.669	5,0 $\pm$ 2,9	0,18 $\pm$ 0,24	0,067	0,54 $\pm$ 0,32	0,56	0,24 $\pm$ 0,13
16	81,7	14.715	5,0 $\pm$ 2,9	0,18 $\pm$ 0,24	0,072	0,56 $\pm$ 0,32	0,59	0,25 $\pm$ 0,13
17	75,1	14.108	5,1 $\pm$ 2,9	0,19 $\pm$ 0,26	0,068	0,55 $\pm$ 0,32	0,58	0,24 $\pm$ 0,13
18	65,9	11.461	5,0 $\pm$ 2,9	0,15 $\pm$ 0,22	0,051	0,52 $\pm$ 0,31	0,52	0,24 $\pm$ 0,13
19	63,9	9.889	5,0 $\pm$ 2,9	0,20 $\pm$ 0,26	0,088	0,59 $\pm$ 0,32	0,63	0,24 $\pm$ 0,13
20	71,9	12.734	5,0 $\pm$ 2,9	0,18 $\pm$ 0,24	0,067	0,54 $\pm$ 0,32	0,55	0,25 $\pm$ 0,13
21	71,6	12.882	5,1 $\pm$ 2,9	0,17 $\pm$ 0,24	0,064	0,55 $\pm$ 0,32	0,57	0,24 $\pm$ 0,13
22	61,3	10.442	5,0 $\pm$ 2,9	0,16 $\pm$ 0,23	0,061	0,54 $\pm$ 0,32	0,55	0,25 $\pm$ 0,13
23	52,5	9.369	5,1 $\pm$ 2,9	0,17 $\pm$ 0,24	0,063	0,55 $\pm$ 0,32	0,58	0,25 $\pm$ 0,13
24	62,3	11.300	5,1 $\pm$ 2,9	0,17 $\pm$ 0,23	0,063	0,54 $\pm$ 0,32	0,56	0,25 $\pm$ 0,13
25	42,8	7.537	5,1 $\pm$ 2,9	0,16 $\pm$ 0,22	0,058	0,55 $\pm$ 0,32	0,56	0,23 $\pm$ 0,13
26	51,6	9.503	5,0 $\pm$ 2,9	0,17 $\pm$ 0,23	0,062	0,54 $\pm$ 0,31	0,56	0,24 $\pm$ 0,13
27	45,4	7.963	5,0 $\pm$ 2,9	0,09 $\pm$ 0,18	0,020	0,42 $\pm$ 0,31	0,36	0,25 $\pm$ 0,13
28	46,2	7.858	4,9 $\pm$ 2,9	0,02 $\pm$ 0,07	0,003	0,25 $\pm$ 0,25	0,16	0,25 $\pm$ 0,13
29	51,1	8.289	4,9 $\pm$ 2,9	0,003 $\pm$ 0,01	0,001	0,12 $\pm$ 0,14	0,07	0,24 $\pm$ 0,13

BTA: autossomo *Bos taurus*; SNP: polimorfismos de base única; MAF: alelo de menor frequência. ¹Desvio padrão.

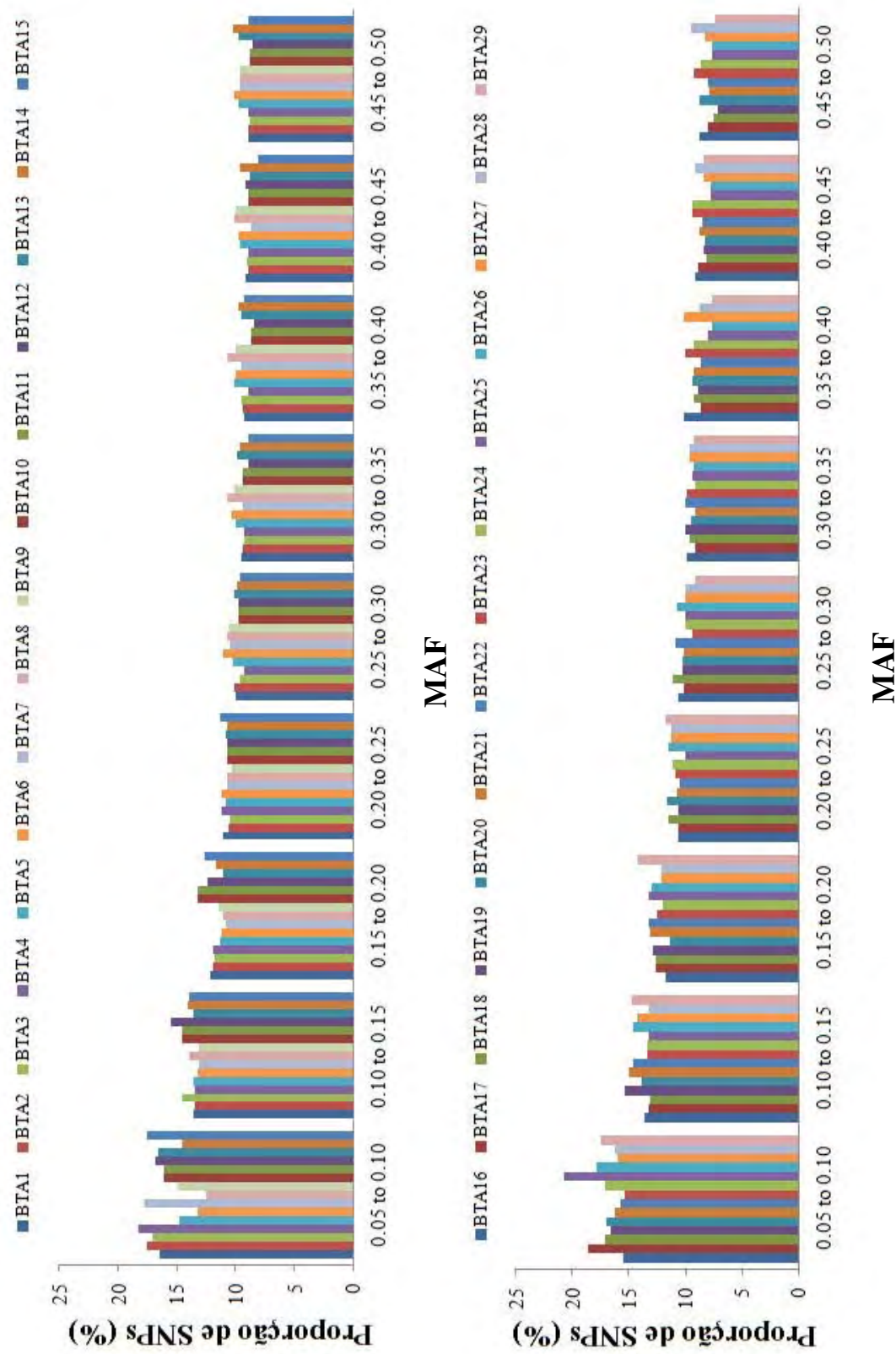


Figura 1. Proporções médias de SNPs para vários intervalos de MAF por cromossomo bovino (BTA).

Todos os possíveis pares de SNP com distância igual ou inferior a 100 kb no mesmo cromossomo produziram 9.254.142 combinações de pares de SNPs para estimar o DL nos 29 autossomos. A média geral de DL entre pares de marcadores foi 0,17 e 0,52, para r^2 e $|D'|$, respectivamente. Silva et al. (2010) genotiparam 25 touros da raça Gir com um painel de 54.000 marcadores (SNPs) e obtiveram médias de DL entre os marcadores adjacentes superiores às do presente trabalho, de 0,21 e 0,68 para r^2 e $|D'|$, respectivamente. Para todos os autossomos a média de $|D'|$ foi sempre superior à de r^2 confirmando que a medida $|D'|$ superestima o DL, especialmente no caso de MAF baixo (PRITCHARD, 2001). O DL médio para os autossomos variou de 0,003 a 0,21 para r^2 , e de 0,12 a 0,59 para $|D'|$ (Tabela 3). Silva et al. (2010) trabalhando com bovinos da raça Gir obtiveram valores de DL levemente superiores aos obtidos no presente estudo, os quais variaram de 0,17 a 0,24 e de 0,60 a 0,72, para r^2 e $|D'|$, respectivamente.

Menores níveis de DL ($r^2 < 0,17$) foram estimados nos cromossomos BTA1, BTA27, BTA28, e BTA29. O nível relativamente baixo de DL nestes cromossomos contrasta com os resultados publicados anteriormente para zebuínos (MCKAY et al., 2007; SILVA et al., 2010). De acordo com Arias et al. (2009), existe uma grande variabilidade nas taxas de recombinação nos autossomos que, além de outros fatores, leva a uma considerável diversidade no padrão de DL em diferentes regiões genômicas. Entretanto, no presente estudo, provavelmente, os resultados obtidos no BTA1, BTA27, BTA28 e BTA29 sejam consequência da estrutura dos dados, uma vez que o número de marcadores, a densidade de marcadores, bem como a MAF média e proporção de MAF não variaram em comparação com os outros autossomos estudados.

A fim de analisar o decréscimo no DL com a distância física entre os marcadores, pares de SNP foram classificados em intervalos (*bins*) com base na distância entre marcadores. Os valores médios de r^2 e $|D'|$ foram estimados para cada *bin* por autossomo (Figuras 2 e 3) e para o genoma total (Tabela 4). O DL diminuiu na medida em que a distância física entre os marcadores aumentou (Tabela 4) e as mudanças de $|D'|$ seguiram um padrão menos acentuado de declínio do DL (Figura 2).

Tabela 4. Desequilíbrio de ligação (r^2 e $|D'|$) entre pares (N) de SNPs para várias distâncias considerando todos os autossomos.

Distância (kb)	N	Média r^2 $\pm$ SD	Mediana r^2	Média $ D' $ $\pm$ SD ¹	Mediana $ D' $	% $r^2 > 0,3$ ¹	% $r^2 > 0,15$ ¹	% $ D' > 0,8$ ¹
0 - 1	54404	0,34 $\pm$ 0,33	0,21	0,72 $\pm$ 0,32	0,90	42	57	44
1 - 2	99488	0,32 $\pm$ 0,33	0,19	0,70 $\pm$ 0,33	0,88	40	55	42
2 - 3	104465	0,31 $\pm$ 0,32	0,18	0,69 $\pm$ 0,33	0,86	38	54	41
3 - 4	112729	0,30 $\pm$ 0,32	0,17	0,68 $\pm$ 0,33	0,84	38	53	40
4 - 5	108799	0,29 $\pm$ 0,31	0,16	0,67 $\pm$ 0,33	0,82	36	51	39
5 - 10	514160	0,27 $\pm$ 0,30	0,14	0,64 $\pm$ 0,33	0,77	33	48	37
10 - 20	977946	0,23 $\pm$ 0,28	0,10	0,60 $\pm$ 0,33	0,68	28	43	34
20 - 30	946535	0,20 $\pm$ 0,26	0,08	0,57 $\pm$ 0,33	0,61	24	38	30
30 - 40	927788	0,18 $\pm$ 0,24	0,07	0,54 $\pm$ 0,33	0,57	21	35	28
40 - 50	918536	0,16 $\pm$ 0,23	0,06	0,52 $\pm$ 0,33	0,53	19	32	26
50 - 60	908630	0,15 $\pm$ 0,22	0,05	0,51 $\pm$ 0,32	0,50	17	29	24
60 - 70	901928	0,14 $\pm$ 0,21	0,05	0,50 $\pm$ 0,32	0,48	15	28	23
70 - 80	895944	0,13 $\pm$ 0,20	0,04	0,48 $\pm$ 0,32	0,47	14	26	21
80 - 90	893132	0,12 $\pm$ 0,19	0,04	0,47 $\pm$ 0,31	0,45	13	24	20
90 - 100	889644	0,11 $\pm$ 0,18	0,04	0,47 $\pm$ 0,31	0,44	12	23	19

SNP: polimorfismos de base única. ¹Porcentagem de pares de SNPs com $r^2 > 0,3$. $r^2 > 0,15$ e $|D'| > 0,8$.

Níveis moderados de r^2 (entre 0,20 e 0,34) foram observados a distâncias entre marcadores inferiores a 30 kb. Quando a distância aumentou de 30 até 100 kb, o r^2 médio diminuiu de 0,20 para 0,11. Uma alta variabilidade nas estimativas de r^2 foi observada para distâncias entre marcadores maiores a 10 kb. Marcadores com DL (r^2) maiores que 0,30 e 0,15 estavam a uma distância média de 38,9 e 41,8 kb, respectivamente. Contudo, nem todos os marcadores com distâncias entre 40 a 50 kb apresentaram um r^2 superior a 0,3.

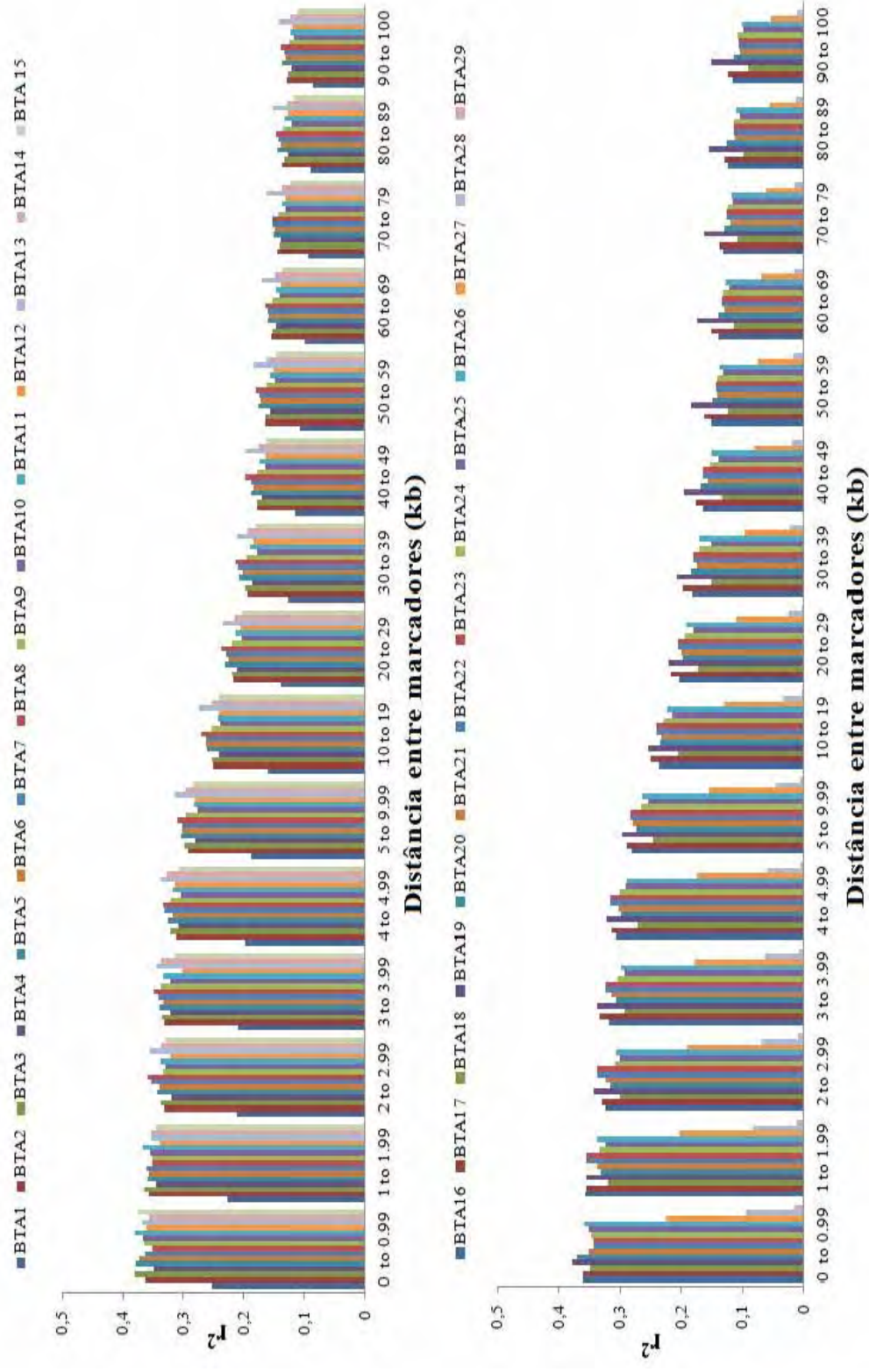


Figura 2. Valores médios de r^2 por cromossomo em função da distância entre marcadores SNPs.

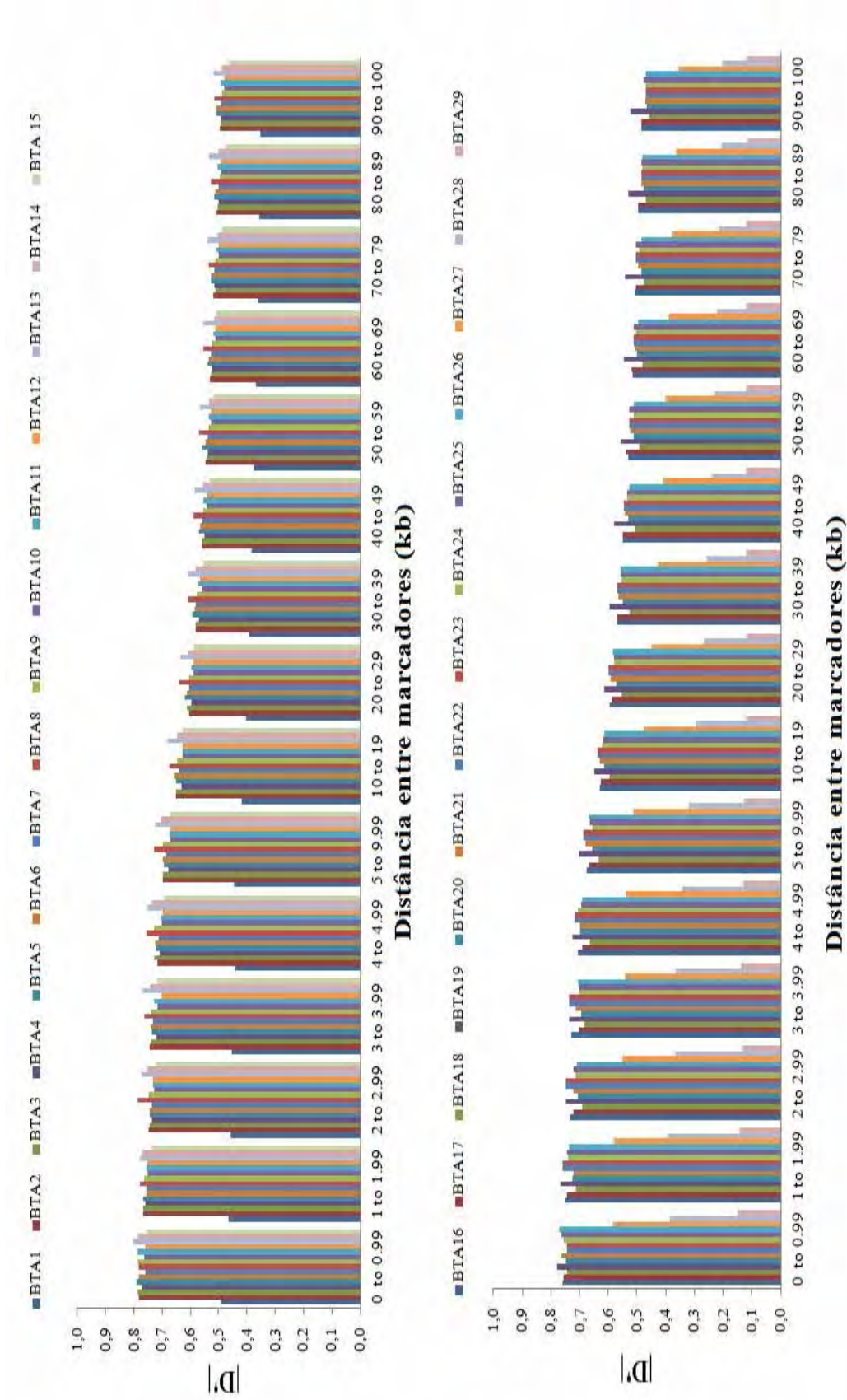


Figura 3. Valores médios de $|D'|$ por cromossomo em função da distância entre marcadores SNPs.

Para distâncias entre marcadores inferiores a 40 kb, a proporção de marcadores com r^2 superior a 0,15 e 0,30, variou de 35 a 57%, e de 21 a 42%, respectivamente. Estas proporções foram inferiores à relatada por Sargolzaei et al. (2008) (68,34%), que genotiparam 821 touros da raça Holandesa com 5.564 SNPs, utilizando limiar de 0,30 para DL (r^2). Recentemente, Qanbari et al. (2010), trabalhando com 810 bovinos da raça Holstein genotipados com o painel Illumina Bovine SNP50K, relataram que, para SNPs espaçados a distâncias menores a 100 kb, a proporção de SNPs com r^2 superior a 0,25 foi de 29%.

Com exceção dos autossomos BTA1, BTA27, BTA28 e BTA29, para distâncias entre marcadores menores a 20 kb o nível de DL (r^2) foi superior a 0,20. Para distâncias menores que 3 kb o nível de DL foi superior a 0,30 (Tabela 4). Quando as distâncias entre marcadores foram superiores a 100kb (resultados não apresentados), o nível médio de DL (r^2) variou de 0,11 (100 kb) a 0,05 (1.000 kb). McKay et al. (2007) estimaram o DL entre todos os pares de marcadores em oito raças bovinas (*Bos taurus* e *Bos indicus*) e relataram que a uma distância física de 100 kb entre marcadores adjacentes o DL (r^2) médio variou de 0,15 a 0,20.

No presente trabalho, determinados autossomos apresentaram maior DL que outros. Quando foram excluídos os autossomos com baixos níveis de DL ($r^2 < 0,17$), como BTA1, BTA26, BTA28 e BTA29, houve uma relação estável entre o comprimento do cromossomo e a medida do DL (r^2), ou seja, na medida em que o tamanho do cromossomo aumentou, o nível de DL variou pouco. De acordo com Arias et al. (2009), as taxas de recombinação diminuem com o aumento do comprimento do cromossomo. Recentemente, Bohmanova et al (2010) não encontraram relação entre o tamanho dos cromossomos e o nível de DL, entretanto, estes autores utilizaram uma população de bovinos *Bos taurus* e uma densidade de marcadores bem menor.

Os pares de SNPs com baixa frequência de alelos tendem a superestimar o DL, portanto, polimorfismos com alta frequência são preferíveis para uma estimativa menos tendenciosa do DL (REICH et al., 2001). Assim, o efeito da MAF sobre as estimativas de $|D'|$ e r^2 foi analisado no presente estudo (Figura 4 e Figura 5).

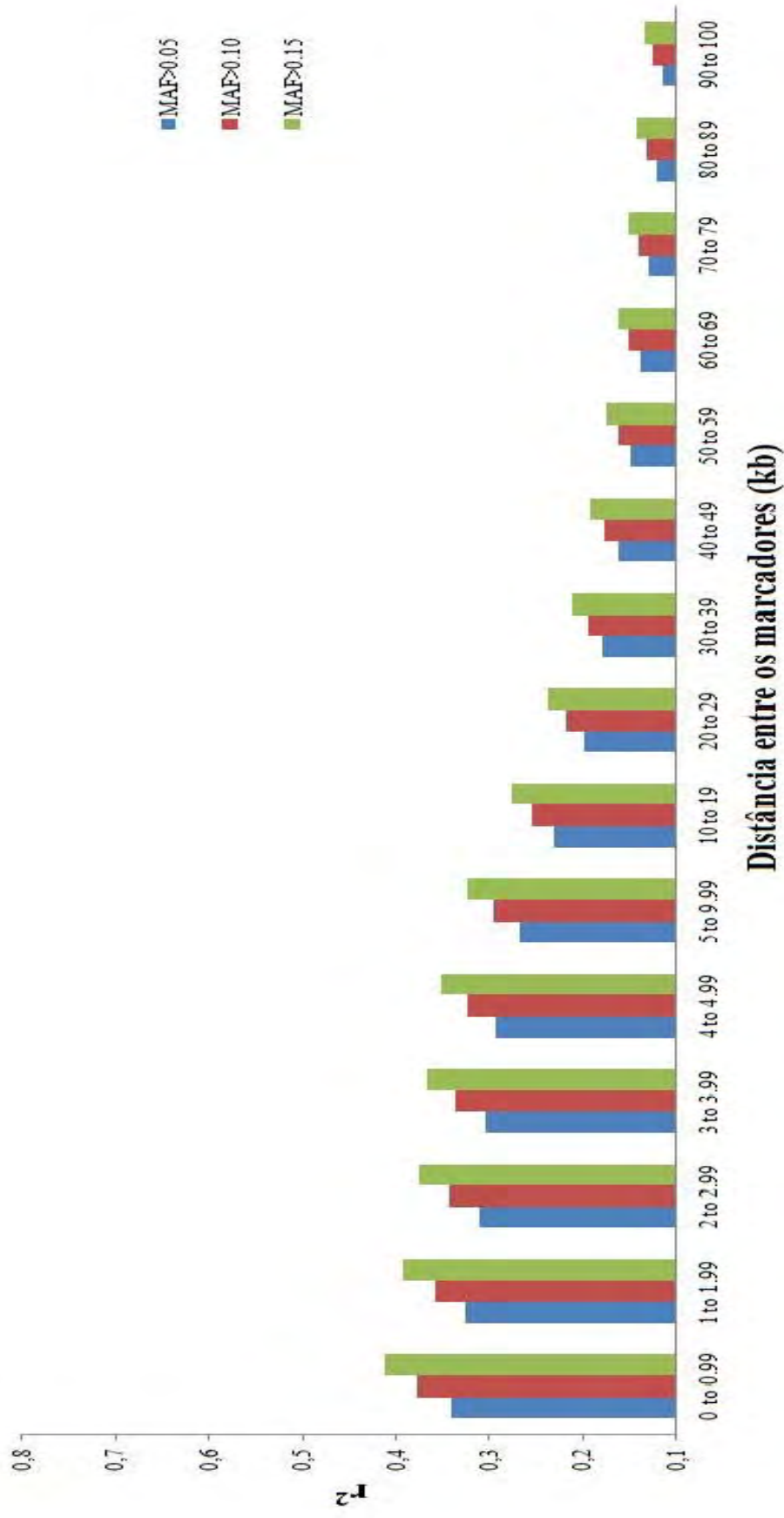


Figura 4. Estimativas médias de r^2 para diferentes limiares de MAF em função da distância entre marcadores.

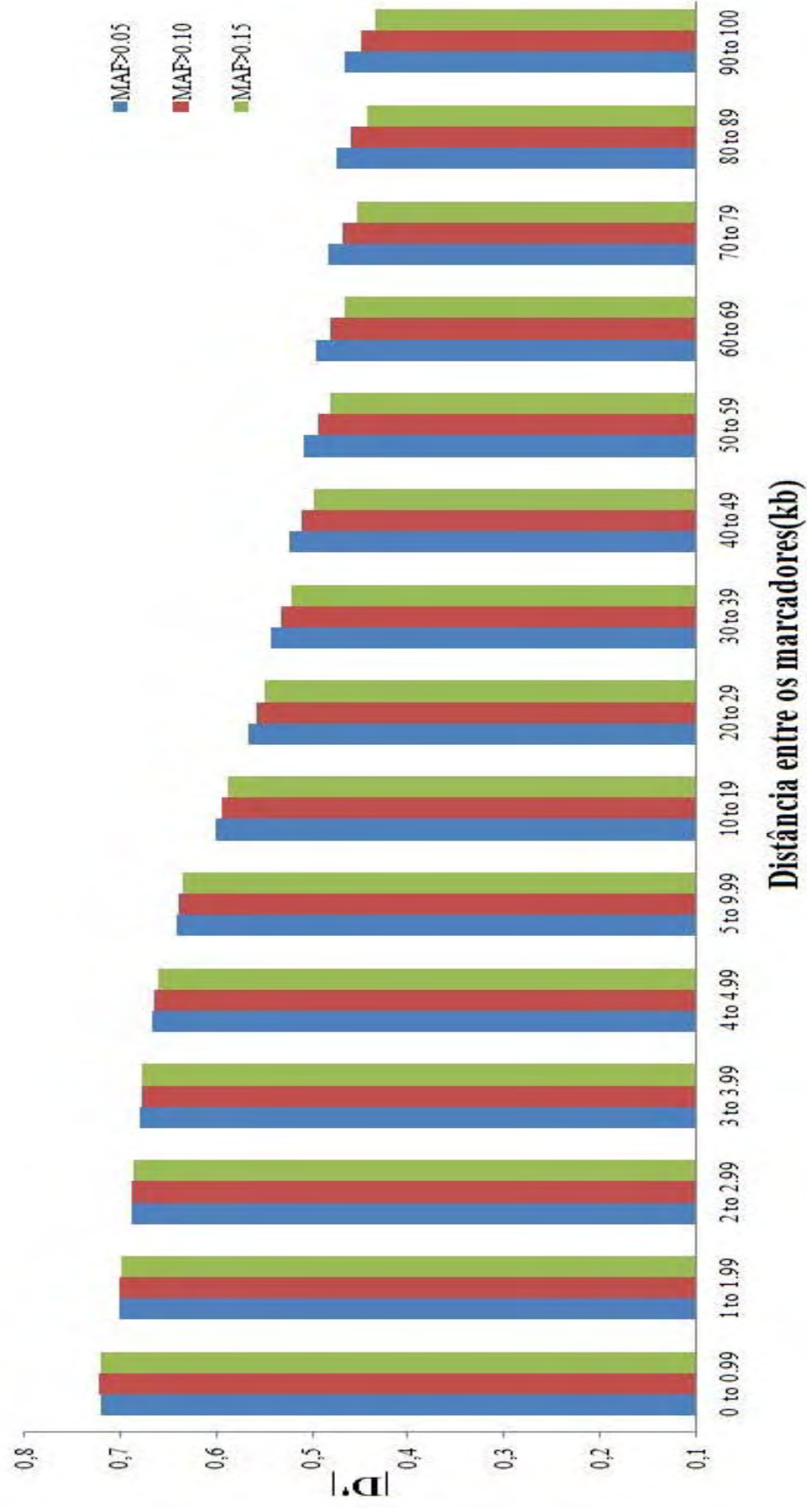


Figura 5. Estimativas médias de $|D'|$ para diferentes limiares de MAF em função da distância entre marcadores.

O DL (r^2) entre marcadores foi maior quando o limiar de MAF foi superior a 0,15, sobretudo para distâncias curtas entre marcadores (Figura 4). Yan et al. (2009), genotiparam 632 linhas de milho com 1.229 marcadores SNPs e mostraram que o DL (r^2) entre marcadores foi maior na medida que o limiar de MAF aumentou, especialmente para pares de SNPs muito próximos (0-10 kb). O $|D'|$ foi menos influenciado pelo limiar aplicado para MAF (Figura 5). Para marcadores mais distantes, o $|D'|$ foi menor à medida que o limiar de MAF aumentou. De acordo com Bohmanova et al (2010), o DL ($|D'|$) é subestimado na medida que o limiar de MAF aumenta (acima de 0,25).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, existe uma considerável variação na magnitude e no padrão do DL no genoma de zebuínos da raça Nelore. Como resultado, dois marcadores que estão muito próximos podem apresentar baixo nível de DL, enquanto que marcadores que estão mais distantes podem mostrar nível mais elevado do que o esperado de DL. Esta variação, provavelmente, é consequência de diferentes taxas de recombinação entre e dentro dos cromossomos, heterozigosidade, deriva genética e efeitos de seleção (BOHMANOVA et al., 2010).

O nível de DL obtido no presente estudo para marcadores adjacentes, a distâncias menores a 30-40 kb, foi inferior em relação ao obtido em outros estudos com bovinos *Bos taurus* e semelhante ou próximo ao relatado em estudos utilizando bovinos *Bos indicus*. Para distâncias entre marcadores superiores a 80 - 100 kb, as diferenças no nível de DL entre raças taurinas e zebuínas diminuem. Contudo, em geral, é difícil comparar níveis de DL obtidos em diferentes estudos por causa de diferentes tamanhos de amostra, forma de mensuração de DL, tipos de marcadores e densidade de marcadores, bem como a história recente da população (PRITCHARD & PRZEWORSKI, 2001). Apesar disto, diferenças entre zebuínos e taurinos no processo histórico de domesticação e seleção, e em consequência do tamanho efetivo das populações podem explicar as discrepâncias no DL a distâncias curtas entre marcadores (TENESA et al., 2007). Outra razão seria o fato que as populações de bovinos *Bos indicus* apresentam maior proporção de MAF em comparação com as populações de *Bos taurus*, o que influencia as estimativas de DL (WEISS et al., 2002; McKAY et al., 2007). O impacto da MAF sobre as

estimativas de DL também foi explorada neste estudo. Os resultados demonstram que a dependência do DL (r^2) do limiar de MAF foi mais forte para SNPs separados por distâncias curtas.

4.2 Associação Genômica Ampla

Dentre os 777.962 marcadores do tipo SNP existentes no BovineHD BeadChip, 446.986 marcadores foram utilizados na análise de associação com as características de maciez da carne e espessura de gordura subcutânea. Um grande número de SNPs está associado às características de carcaça estudadas ($p < 0,01$), como pode ser observado nas Figuras 6 e 7. Aplicando a correção de testes múltiplos de Bonferroni ($p < 1,2 \times 10^{-7}$), para as duas características analisadas, não foram constatados SNPs significativos, provavelmente, porque aplica-se um nível de restrição alto e segundo Kim et al. (2011) este é um teste conservador. Foram encontrados 5.328 e 4.614 marcadores SNP associados significativamente ($p < 0,01$) com a maciez da carne e espessura de gordura, respectivamente. A nível de 5%, estes números aumentaram para 24.333 e 21.940 SNPs (Figuras 6 e 7), respectivamente.

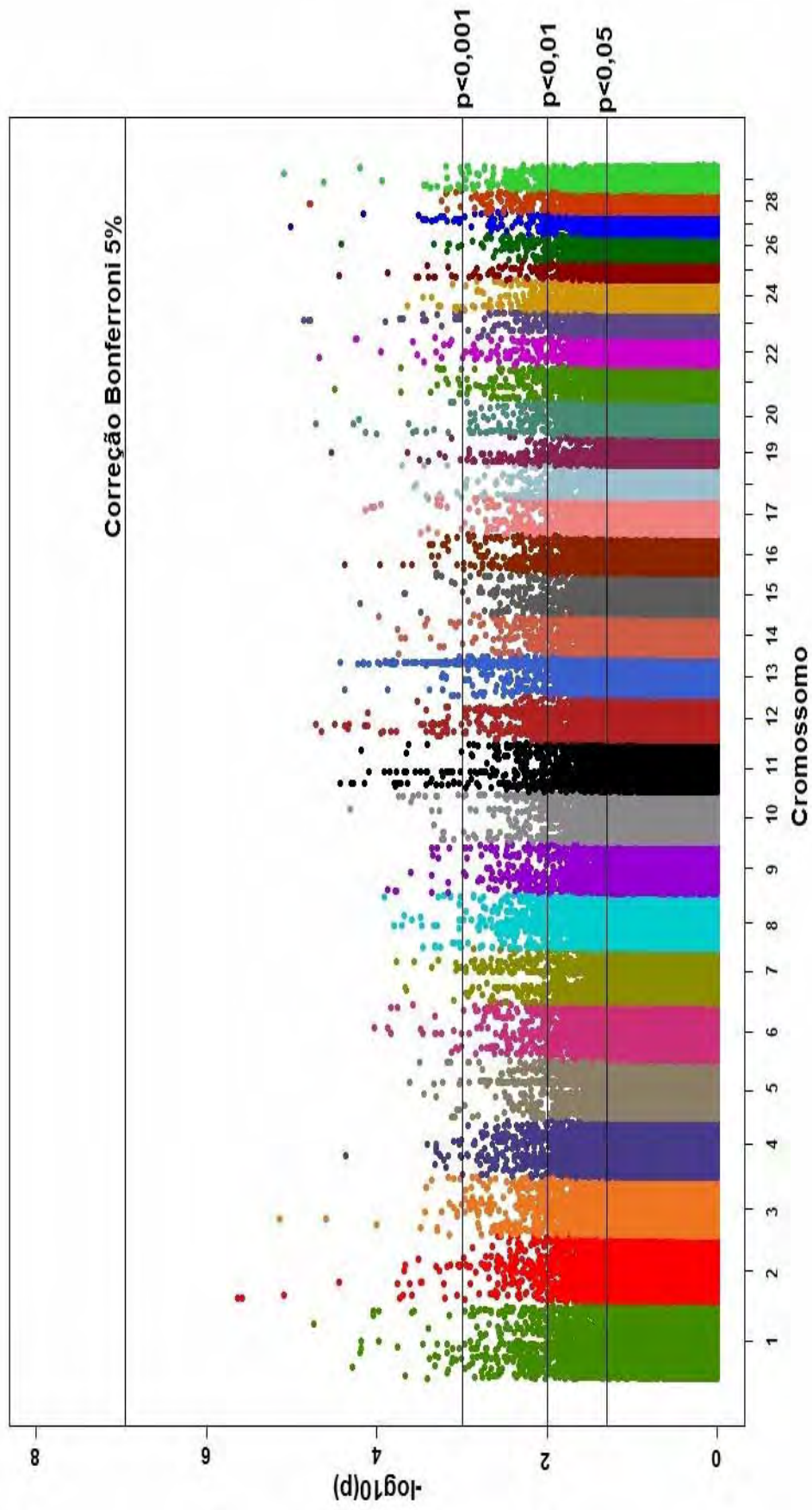


Figura 6. Manhattan plot dos resultados da associação genômica para maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Valores acima de $-\log P > 3$ são equivalentes a $p < 0,001$.

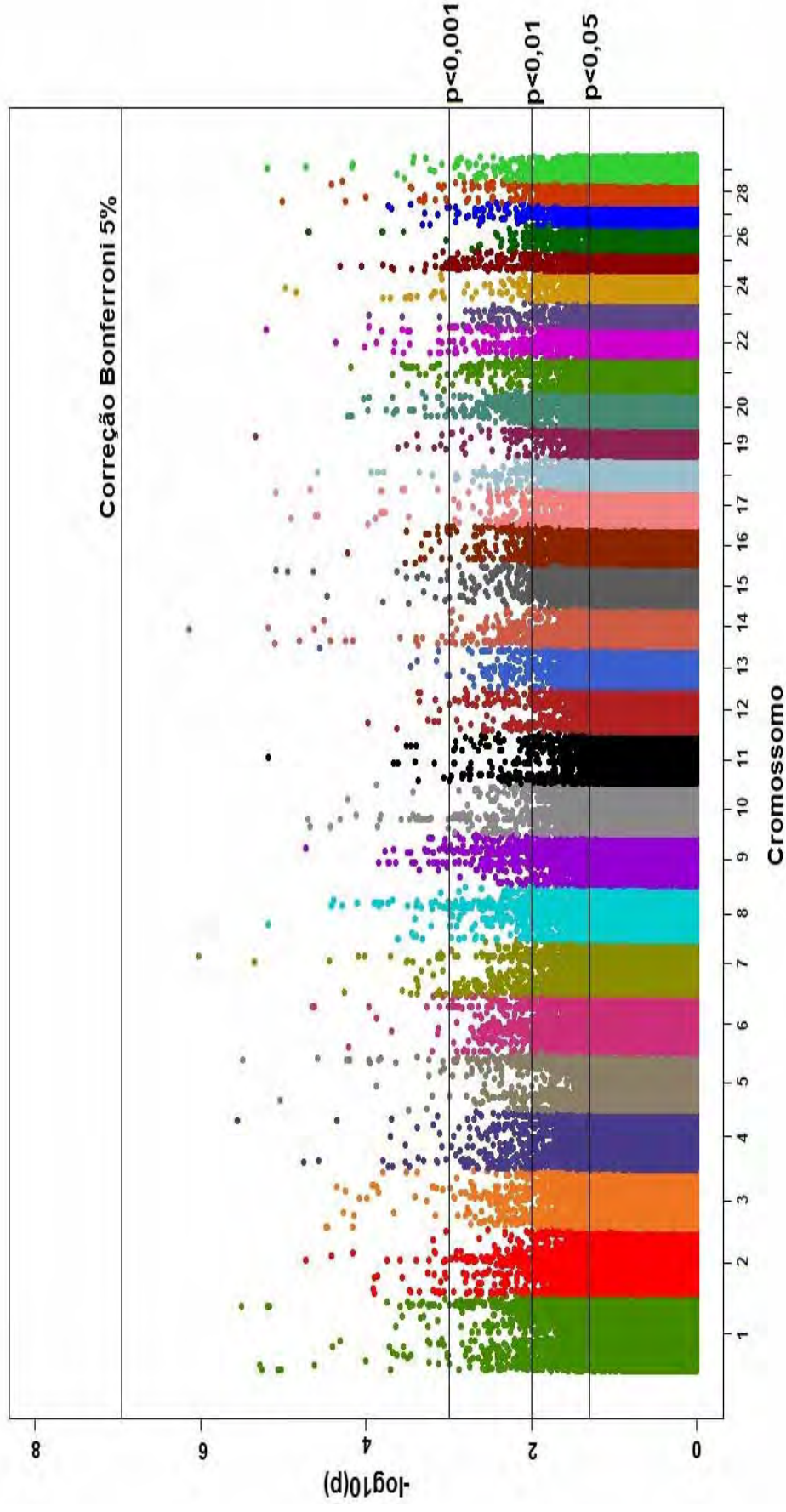


Figura 7. Manhattan plot dos resultados da associação genômica para espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Nelore. Valores acima de $-\log P > 3$ são equivalentes a $p < 0,001$.

No q-q plot, para ambas as características (Figuras 8 e 9), estão representados os $-\log_{10}$ (p-value) observados e esperados para os 446.986 SNPs. Nos níveis mais baixos de significância ($p > 0,001$), os valores observados foram praticamente iguais aos esperados, portanto, seguiram a distribuição da hipótese nula, de que não há associação entre estes SNPs e as características estudadas. A partir de $-\log_{10}$ (p-value) = 3, que corresponde a $p = 0,001$, os valores observados foram se distanciando dos esperados com o aumento do nível de significância. Isto é, distanciaram-se da distribuição esperada sob a hipótese nula, representando os SNPs significativos para a característica, indicando a existência de associação. Apenas para a maciez da carne, nos níveis mais altos de significância ($p > 3,1 \cdot 10^{-5}$), os valores observados foram próximos aos esperados (Figura 8), indicando possível ocorrência de falsos positivos. Desta forma, optou-se por utilizar o nível de significância de $p < 0,001$.

Foram encontrados 644 e 653 SNPs afetando significativamente ($p < 0,001$) a maciez e a espessura de gordura, respectivamente. As taxas de FPR, considerando os SNPs significativos ($p < 0,001$), foram muito próximas: 69 e 68% para a maciez da carne e espessura de gordura subcutânea, respectivamente. Essas taxas são inferiores às encontradas por Bolormaa et al (2011b) que genotiparam 940 bovinos de diferentes raças para maciez da carne e espessura de gordura na região da garupa (picanha) e observaram FPR de 84% para ambas as características. Porém, os autores utilizaram painel de SNPs com aproximadamente 54.000 marcadores e valor de $p < 0,001$.

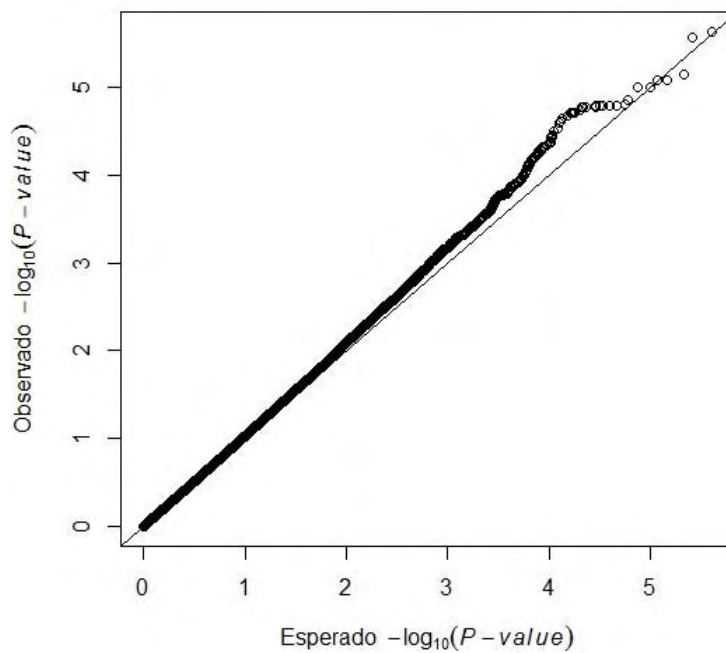


Figura 8. Gráfico quantil-quantil da distribuição dos valores observados para o estudo de associação genômica da macie� da carne comparado com a distribuição normal.

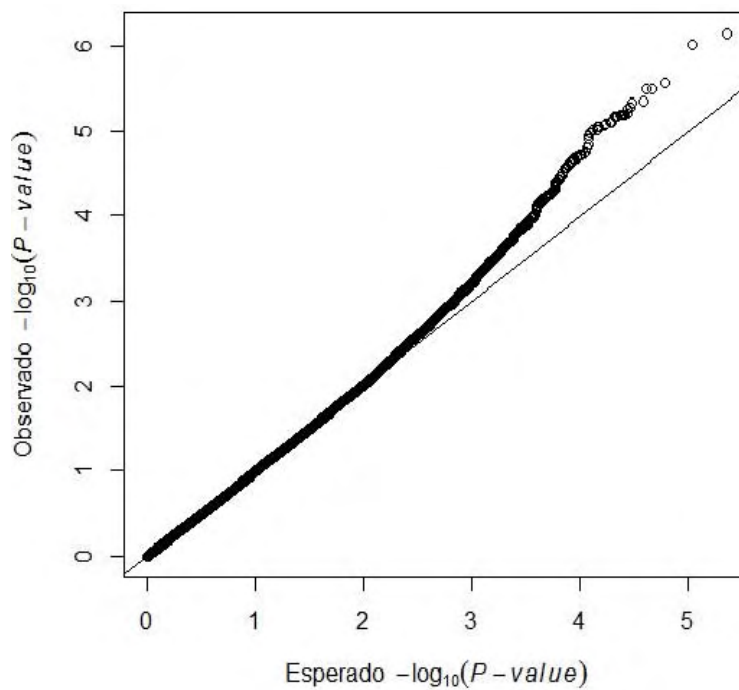


Figura 9. Gráfico quantil-quantil da distribuição dos valores observados para o estudo de associação genômica da espessura de gordura subcutânea comparado com a distribuição normal.

Quanto à maciez da carne, os principais picos de SNPs significativos ($p < 0,001$) foram observados nos cromossomos 13, 12 e 11 (Figura 6). O cromossomo 13 foi o que apresentou maior concentração de marcadores SNPs significativos (Tabela 5), enquanto que os de menor número foram os cromossomos 19 e 26.

Tabela 5. Número de marcadores SNPs significativos ($p < 0,001$) por cromossomo para a maciez da carne e a espessura de gordura subcutânea.

Cromossomo	SNPs significativos ($p < 0,001$)	
	Maciez da carne	Espessura de gordura
1	32	59
2	29	44
3	20	28
4	17	22
5	22	24
6	23	16
7	10	68
8	29	38
9	18	38
10	22	35
11	48	11
12	48	10
13	105	7
14	14	19
15	11	19
16	16	16
17	14	16
18	11	7
19	8	9
20	14	40
21	16	21
22	19	25
23	26	3
24	10	16
25	12	16
26	7	9
27	16	8
28	9	17
29	18	12
TOTAL	644	653

No cromossomo 12 foram encontrados 48 SNPs significativos ($P < 0,001$) para a maciez da carne, sendo que 15 destes estavam fisicamente muito próximos

(33.340 kb a 33.776 kb). Resultados semelhantes foram relatados por Bolormaa et al (2011b), que encontraram 9 SNPs significativos ($p < 0,001$) no cromossomo 12 para a maciez da carne, utilizando para isso 940 bovinos de diferentes raças (Angus, Hereford, Murray Grey, Shorthorn, Brahman, Santa Gertrudis) genotipados com o Illumina BovineSNP50, com aproximadamente 54.000 marcadores do tipo SNP. O cromossomo 11 apresentou 48 marcadores SNPs significativos para a maciez da carne ($p < 0,001$) sendo que 15 destes estavam fisicamente próximos (40.984 kb a 41.233 kb). Resultados semelhantes foram encontrados por Gutierrez et al. (2008), que utilizaram 165 marcadores microssatélites em 235 animais da raça Charolês x Holandês e identificaram 2 QTL para maciez da carne. O cromossomo 13 apresentou 105 marcadores SNPs significativos ($p < 0,001$), entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que reportem QTL para a maciez da carne nesse cromossomo. Porém, foram observados 53 SNPs significativos ($P < 0,001$) localizados muito próximos entre si (68.071 kb a 68.986 kb). Estes resultados são sugestivos de ocorrência de possíveis QTL.

Em consulta realizada no Cattle QTL Database (CATTLE QTL DATABASE, 2013), não foram encontrados QTL associados à maciez de carne no cromossomo 13. Mais estudos e pesquisas precisam ser direcionados a esse cromossomo. Os resultados do presente estudo diferem dos reportados por Davis et al. (2007) que encontraram QTL associados a maciez da carne no cromossomo 8 em uma população de 598 animais da raça Charolês, Brahman e Belmont Red, utilizando para isso 183 marcadores cobrindo todo o genoma bovino. Os autores reportaram, ainda, QTL no cromossomo 7 e 10 para maciez da carne que ainda não haviam sido localizados.

A distribuição dos SNPs, no manhattan plot, mostra maiores picos de marcadores associados ($p < 0,001$) à espessura de gordura subcutânea nos cromossomos 7, 8 e 10 (Figura 8) com, respectivamente, 68, 38 e 35 SNPs significativos ($p < 0,001$) (Tabela 5). O cromossomo 7 apresentou maior quantidade de SNPs significativos ($p < 0,001$), fato que não ocorreu com os cromossomos 8 e 10 (Tabela 5). Porém, esses últimos obtiveram regiões de concentração de SNPs significativos ($p < 0,001$) menos dispersas (Figura 8).

Um total de 27 marcadores estavam fisicamente muito próximos (79.040 a 79.808 kb) na região do cromossomo 7. Casas et al. (2003), utilizando 312 marcadores em uma população de 547 bovinos cruzados (Brahman x Hereford) reportaram marcadores para espessura de gordura nos cromossomos 2, 3, 7 e 14. No cromossomo 8, cerca de 7 marcadores estavam em uma região delimitada entre 75.294 e 75.916 kb, muitos próximos fisicamente. Resultados semelhantes foram descritos por Casas et al. (2001), que estudaram 89 marcadores em 455 animais das raças Belgian Blue, Piemontês e Angus, e encontraram marcadores significativos para espessura de gordura ($p < 0,0003$) no cromossomo 8 e para gordura intramuscular ($p < 0,0007$) no cromossomo 10. Os resultados do presente trabalho diferem dos reportados por Nalaila et al. (2011), que identificaram associação de espessura de gordura com SNPs localizados nos cromossomos 1, 5, 6, 19 e 21 em bovinos cruzados (Angus x Charolês). Ainda, estes resultados contrastam com os relatados por Peters et al. (2012) que encontraram 7 e 24 SNPs significativos ($p < 0,001$) para espessura de gordura, nos cromossomos 4 e 14, respectivamente. Segundo informações do Cattle QTL Database (CATTLE QTL DATABASE, 2013), não foram observados no cromossomo 10 registros de QTL associado à espessura de gordura. É importante ressaltar que os SNPs significativos ($p < 0,001$) podem compor um conjunto de marcadores para bovinos Nelore visando à predição de valores genéticos (genômicos) para maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.

A estimação dos efeitos dos SNPs sobre as duas características estudadas foi realizada para cada marcador (Figuras 10 e 11). A maioria dos efeitos foi muito próxima de zero, ou com valor muito pequeno, resultado esperado já que, como apresentado nas Figuras 6 e 7, grande parte dos SNPs não estão significativamente ($p < 0,001$) associados às características. Os marcadores mais significativos ($p < 0,001$), localizados no cromossomo 13, 12, 11 (maciez da carne) e 7, 8, 10 (espessura de gordura subcutânea), não foram, essencialmente, os que apresentaram maiores efeitos (Tabela 6). O efeito de substituição alélica – a troca de um alelo A por um alelo B – provavelmente tenha sido superestimado. Como os modelos incluíram apenas um SNP, o efeito estimado para aquele SNP pode estar incluindo os efeitos de vários marcadores que estejam fisicamente próximos, na

mesma região do cromossomo. Além disto, o efeito poligênico não foi considerado no modelo.

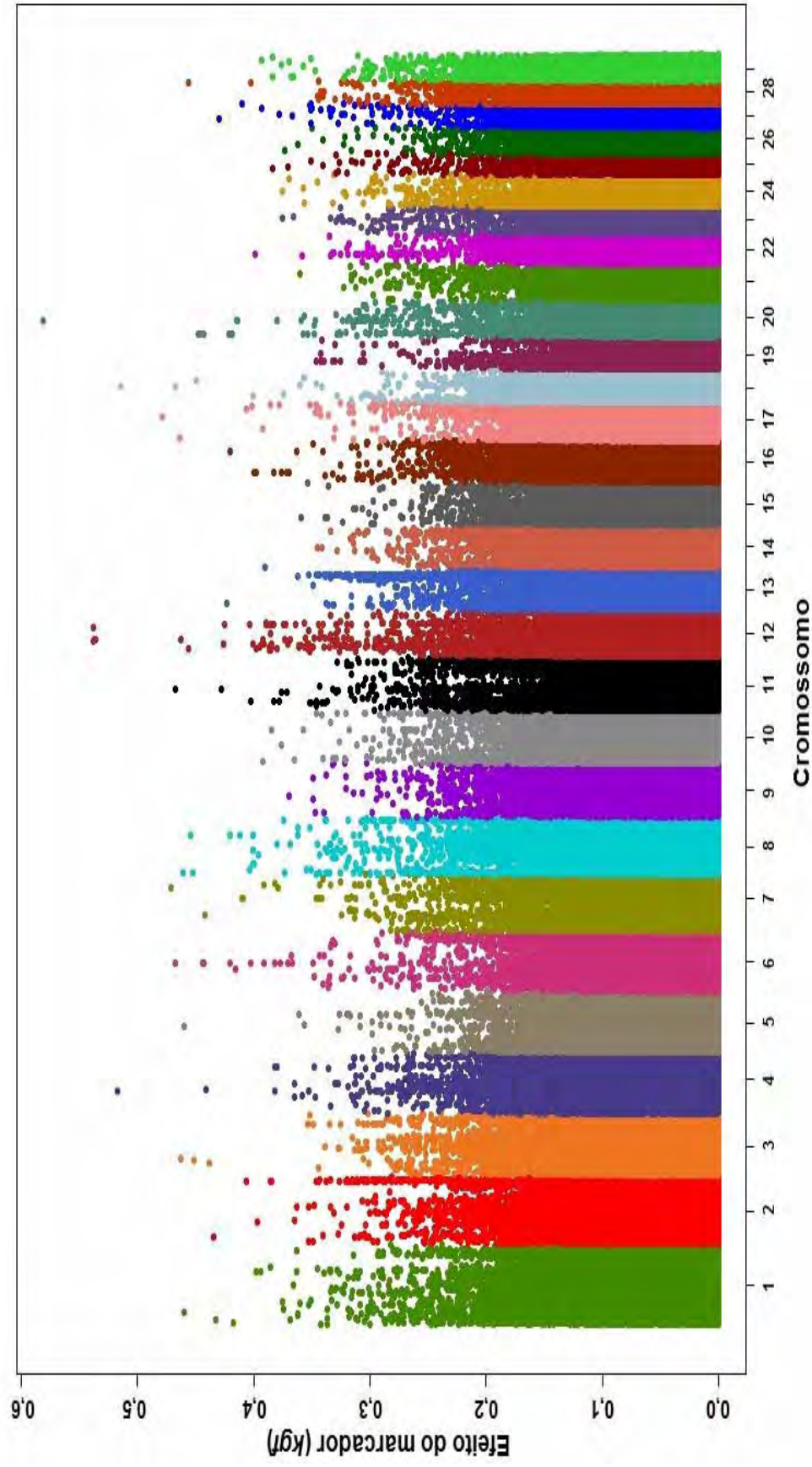


Figura 10. Manhattan plot dos efeitos (absolutos) para cada marcador SNP em função dos cromossomos para a maciez da carne.

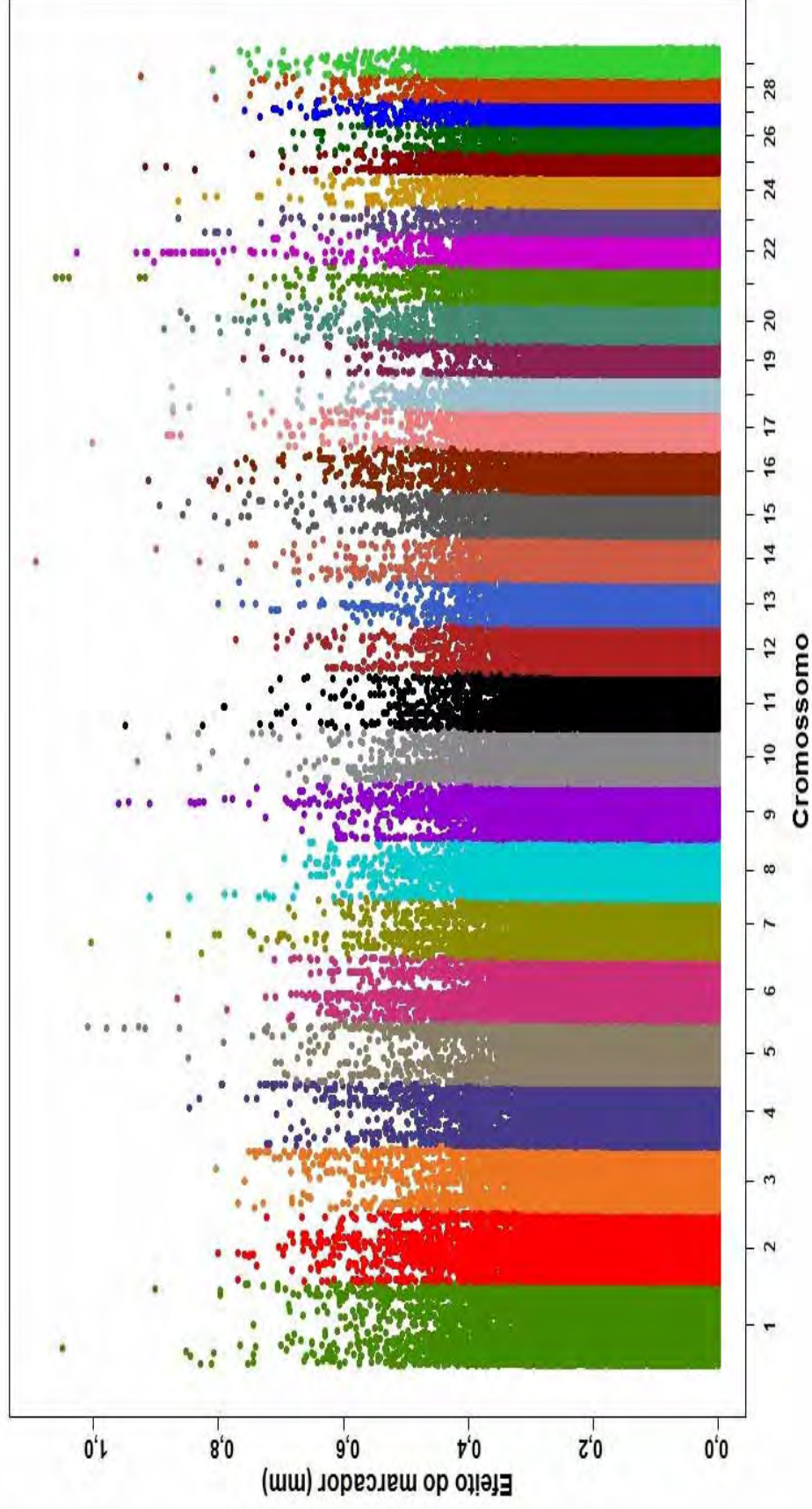


Figura 11. Manhattan plot dos efeitos (absolutos) para cada marcador SNP em função dos cromossomos para a espessura de gordura subcutânea.

Tabela 6. Efeito, polimorfismos e frequências dos marcadores SNPs mais significativos para a maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.

Característica	SNP	Cromossomo	Posição (pb) ²	Efeito ¹	Erro-padrão	Valor de p	Polimorfismo ³	Freq. AA ⁴	Freq. AB ⁴	Freq. BB ⁴	Freq. A ⁵	Freq. B ⁵
Maciez da carne ¹	BovineHD1300019351	13	68110892	0,2629	0,0603	5,98x10 ⁻⁵	A/G	0,68	0,31	0,01	0,83	0,17
	BovineHD1300019341	13	68075857	0,2512	0,0607	1,07x10 ⁻⁴	A/G	0,33	0,48	0,19	0,57	0,43
	BovineHD1300019339	13	68070561	-0,2497	0,0609	8,08x10 ⁻⁵	A/G	0,01	0,31	0,68	0,17	0,83
	BovineHD1200009786	12	33339536	0,5365	0,1172	3,15x10 ⁻⁵	T/C	0,26	0,45	0,29	0,49	0,51
	BovineHD4100009512	12	33376720	0,4625	0,1027	4,71x10 ⁻⁵	T/C	0,63	0,33	0,04	0,79	0,21
	BovineHD1200009792	12	33379888	0,2353	0,0595	4,45x10 ⁻⁴	T/C	0,06	0,43	0,51	0,28	0,72
	BovineHD1100031600	11	41043947	0,2700	0,0679	1,68x10 ⁻⁴	T/C	0,08	0,51	0,40	0,34	0,66
	BovineHD1100012018	11	40983758	-0,2135	0,0587	9,56x10 ⁻⁴	T/G	0,00	0,24	0,76	0,12	0,88
Espessura de gordura subcutânea ¹	BovineHD1100012028	11	41035823	-0,2135	0,0587	9,56x10 ⁻⁴	T/C	0,66	0,32	0,02	0,82	0,18
	BovineHD1000010002	10	30586870	0,6695	0,1517	4,85x10 ⁻⁵	T/C	0,46	0,44	0,10	0,68	0,32
	BovineHD1000030592	10	30491119	-0,5825	0,1428	2,62x10 ⁻⁴	T/C	0,82	0,16	0,02	0,90	0,10
	BovineHD1000010009	10	30603307	-0,4339	0,1322	4,40x10 ⁻⁴	A/G	0,26	0,49	0,25	0,50	0,50
	BovineHD0800022556	8	75334899	0,5045	0,1405	1,60x10 ⁻⁴	T/C	0,24	0,46	0,30	0,47	0,53
	BovineHD0800022544	8	75294171	-0,4775	0,1296	1,40x10 ⁻⁴	A/G	0,03	0,21	0,76	0,13	0,87
	BTB-00358369	8	75347512	-0,4441	0,1268	6,13x10 ⁻⁴	T/C	0,81	0,19	0,01	0,90	0,10
	BovineHD0700023135	7	79040181	0,6787	0,2353	9,43x10 ⁻⁷	T/C	0,36	0,54	0,10	0,63	0,37
	BovineHD0700023156	7	79114820	0,2723	0,2019	7,60x10 ⁻⁴	T/C	0,10	0,41	0,49	0,31	0,69
	BovineHD0700033150	7	79270244	0,2723	0,2019	7,60x10 ⁻⁴	A/G	0,32	0,50	0,18	0,57	0,43

¹ Unidade do Efeito para maciez da carne: kgf; e espessura de gordura: mm.

² Posição do SNP; unidade em pares de bases.

³ Polimorfismo: substituição do nucleotídeo no SNP.

⁴ Frequência dos genótipos AA, AB e BB.

⁵ Frequência dos alelos A e B.

Consultando informações no Map Viewer - Build 6.1 (NCBI, 2013) para bovinos, foram encontrados vários genes próximos aos SNPs significativos ($p < 0,001$) para maciez da carne e espessura de gordura subcutânea (Tabela 7). A distância está determinada em pares de bases do SNP até o início ou do SNP até o final do gene, de acordo com a posição do polimorfismo no cromossomo. Distância igual à zero indica que o SNP está localizado dentro da região compreendida pelo gene.

Tabela 7. Distâncias entre genes e marcadores SNPs mais significativos ($p < 0,001$) para maciez da carne e espessura de gordura subcutânea.

Característica	SNP	Cromossomo	Posição (pb ¹)	Gene ²	Distância (pb ¹)
Maciez da carne	BovineHD1300019351	13	68110892	ADIG	0
	BovineHD1300019341	13	68075857	ADIG	43660
	BovineHD1300019339	13	68070561	ADIG	48956
	BovineHD1200009786	12	33339536	CDK8	0
	BovineHD4100009512	12	33376720	CDK8	6469
	BovineHD1200009792	12	33379888	CDK8	9637
	BovineHD1100031600	11	41043947	FANCL	299528
	BovineHD1100012018	11	40983758	FANCL	239339
	BovineHD1100012028	11	41035823	FANCL	291404
Espessura de gordura subcutânea	BovineHD1000010002	10	30586870	ZNF770	59533
	BovineHD1000030592	10	30491119	ZNF770	33649
	BovineHD1000010009	10	30603307	ZNF770	75970
	BovineHD0800022556	8	75334899	ADRA1A	28536
	BovineHD0800022544	8	75294171	ADRA1A	69264
	BTB-00358369	8	75347512	ADRA1A	15923
	BovineHD0700023135	7	79040181	LOC785099	243213
	BovineHD0700023156	7	79114820	LOC785099	168574
	BovineHD0700033150	7	79270244	LOC785099	13150

¹Unidade em pares de bases

²ADIG-adipogenin; CDK8-cyclin-dependent kinase 8; FANCL-Fanconi anemia, complementation group L; ZNF770-zinc finger protein 770; ADRA1A-adrenergic, alpha-1A-, receptor; LOC785099-calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3-like.

5. CONCLUSÕES

O nível de desequilíbrio de ligação estimado para marcadores espaçados até 30 kb assegura um r^2 acima de 0,20, o que sugere que as estratégias de mapeamento explorando DL podem ser eficazes em zebuínos.

Foram identificados marcadores SNPs afetando significativamente a maciez da carne nos cromossomos 13, 12 e 11; e a espessura de gordura subcutânea, nos cromossomos 7, 8 e 10.

6. REFERÊNCIAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias de Carne. **Exportações de Carne Bovina do Brasil**. 2012.

ALAM, M.; LEE, Y. M.; PARK, B. L.; KIM, J. H.; LEE, S. S.; SHIN, H. D.; KIM, K. S.; KIM, N. S.; KIM, J. J. A whole-genome association study to detect single nucleotide polymorphisms for body conformation traits in a Hanwoo population. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.24, no.3, p.322-329, 2011.

ANDERSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Natural Review Genetics**, v.2, p.130-138, 2001.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2011.

ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Natural Review Genetics**, v.3, p.299–309, 2002.

ARIAS, J. A.; KEEHAN, M.; FISHER, P.; COPPIETERS, W. SPELMAN, R. A high density linkage map of the bovine genome. **BMC Genetics**, v.10:18, 2009.

BARTON, N. H.; KEIGHTLEY, P. D. Understanding Quantitative Genetic Variation, **Natural Review Genetics**, v.3, p.11-21, 2002.

BECKMANN, J. S.; KASHI, Y.; HALLERMAN, E. M. Restriction fragment length polymorphism among Israeli Holstein-Friesian dairy bulls. **Animal Genetics**, v.17, n.1, p.25-38, 1986.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n.1, p.289-300, 1995.

BENNETT, G. L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.837-848, 2009.

BENNEWITZ, J.; SOLBERG, T.; MEUWISSEN, T. **Genomic breeding value estimation using nonparametric additive regression models**. Genetics Selection Evolution, v.41, p.20, 2009.

BOHMANOVA, J.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. **BMC Genomics**, v.11, p.421, 2010.

BOLEMAN, S. J.; MILLER, R. K.; TAYLOR, J. F.; CROSS, H. R.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAE, M.; SHACKELFORD, S. D.; MILLER, M. F.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; SAVELL, J. W. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1521–1524, 1997.

BOLORMAA, S.; HAYES, B. J.; SAVIN, K.; HAWKEN, R.; BARENDSE, W.; ARTHUR, P. F.; HERD, R. M.; GODDARD, M. E. Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1684-1697, 2011a.

BOLORMAA, S.; PORTO NETO, L. R.; ZHANG, Y. D.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; GODDARD, M. E.; BARENDSE, W. A genome-wide association study of meat and carcass traits in Australian cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2297-2309, 2011b.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. Cadeia Produtiva da Carne Bovina. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p.86. (Serie de Agronegocios, v.8), 2007.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

CAFE, L. M.; McINTYRE, B. L.; ROBINSON, D. L.; GEESINK, G. H.; BARENDSE, W.; PETHICK, D. W.; THOMPSON, J. M.; GREENWOOD, P. L. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 2. Objective meat quality. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3059-3069, 2010.

CALUS, M. P. L.; ROOS, S. P. W.; VEERKAMP, R. F. Estimating genomic breeding values from the QTL-MAS workshop data using a single SNP and haplotype/IBD approach. **BMC Proceedings**, v.3, S01 - S10, 2009.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T. P. L.; STONE, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2976-2983, 2003.

CASAS, E.; STONE, R. T.; KEELE, J. W.; SHACKELFORD, S. D.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. **Journal of Animal Science**, v.79, p.854-860, 2001.

CATTLE QTL DATABASE. Disponível em: <http://www.genome.iastate.edu/cgi-bin/QTLdb/BT/ontrait?trait_ID=1444>. Acesso em: 20 de janeiro de 2013.

CHARDON, P.; VAIMAN, M.; KIRSZENBAUM, M. Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the pig. **Immunogenetics**, v.21, n.2, p.161-171, 1985.

CHEN, X.; SULLIVAN, P. F. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. **Pharmacogenomics**, v.3, p.77-96, 2003.

CUNDIFF, L. V. Breeds and Genetics. In: POND, W. G.; BELL, A. W. **Encyclopedia of Animal Science**. Ithaca: Cornell, 800 p., 2004.

CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; GREGORY, K. E.; CROUSE, J. D.; DIKEMAN, M. E. Characteristics of diverse breeds in cycle IV of the cattle germplasm evaluation. **Beef Research Progress Report**, v.71, p.57-60, 1993.

DAETWYLER, H. D.; SCHENKEL, F. S.; SARGOLZAEI, M.; ROBINSON, J. A. B. A Genome Scan to Detect Quantitative Trait Loci for Economically Important Traits in Holstein Cattle Using Two Methods and a Dense Single Nucleotide Polymorphism Map. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3225–3236, 2008.

DAVIS, G. P.; MOORE, S. S.; DRINKWATER, R. D.; SHORTHORSE, W. R.; LOXTON, I. D.; BARENDSE, W.; HETZEL, D. J. S. QTL for meat tenderness in the *M. longissimus lumborum* of cattle. *Animal Genetics*, v.39, p.40-45, 2007.

DEVITT, C. J. B.; WILTON, J. W.; MANDELL, I. B. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, v.31, p.455–458, 2002.

FARNIR, F.; COPPIETERS, W.; ARRANZ, J. J.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; GRISART, B.; KARIM, L.; MARCQ, F.; MOREAU, L.; MNI, M.; NEZER, C.; SIMON, P.; VANMANSHOVEN, P.; WAGENAAR, D.; GEORGES, M. Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. **Genome Research**, v.10, p.220-227, 2000.

FELÍCIO, P. E. Fatores *ante e post mortem* que influenciam na qualidade da carne bovina. In: **Produção do novilho de corte**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, p.79-97, 1997.

FERRAZ, J. B. S.; PINTO, L. F. B.; MEIRELLES, F. V.; ELER, J. P.; REZENDE, F. M.; OLIVEIRA, E. C. M.; ALMEIDA, H. B.; WOODWARD, B.; NKRUMAH, D. Association of single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.1360-1366, 2009.

GIBBS, R. A.; TAYLOR, J. F.; VAN Tassell C. P.; BARENDSE, W.; EVERSOLE, K. A.; GILL, C. A.; GREEN, R. D.; HAMERNIK, D. L.; KAPPES, S. M.; LIEN, S. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. **Science**, v.324, p.528-532, 2009.

GILL, J.L.; BISHOP, S.C.; McCORQUODALE, C.; WILLIAMS, J.L.; WIENER, P. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. **Bioinformatics**, v.10, p.41-36, 2009.

GODDARD, M.E. Mapping genes for quantitative traits using linkage disequilibrium. **Genetics Selection Evolution**, v.23, p.131-134, 1991.

GUTIÉRREZ, B. G.; WIENER, P.; NUTE, G. R.; BURTON, D.; GILL, J. L.; WOOD, J. D.; WILLIAMS, J. L. Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. **Animal Genetics**, v.39, p.51-61, 2008.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. J.; GODDARD, M. E. Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.433- 443, 2009.

HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetics Research**, v.38, p.209–216, 1981.

HILL, W. G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.38, p.226-231, 1968.

HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Natural Review Genetics**, v.6, p.95-108, 2005.

HUFFMAN, K. L.; MILLER, M. F.; HOOVER, L. C.; WU, C. K.; BRITTIN, H. C.; RAMSEY, C. B. Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant. **Journal of Animal Science**, v.74, p.91–97, 1996.

ILLUMINA, Inc. Disponível em <http://www.illumina.com/products/bovinehd_wholegenome_genotyping_kits.ilmn>). Acesso em 07 de janeiro de 2013.

ISLAM, K. K.; VINSKY, M.; CREWS, R. E.; OKINE, E.; MOORE, S. S.; CREWS Jr, D. H.; LI, C. Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in hybrid, Angus and Charolais beef cattle. **Animal Genetics**, v.40, p.766-769, 2009.

KIM, Y.; RYU, J.; WOO, J.; KIM, J. B.; KIM, C. Y.; LEE, C. Genome-wide association study reveals five nucleotide sequence variants for carcass traits in beef cattle. **Animal Genetics**, p.1-5, 2011.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M. P.; SHACKELFORD, S. D. et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v.62, p.345–352, 2002.

MARQUES, E.; SCHNABEL, R.; STOTHARD, P. et al. High density linkage disequilibrium maps of chromosome 14 in Holstein and Angus cattle. **BMC Genetics**, v.9, p.45, 2008.

MATUKUMALLI L.K.; LAWLEY C.T., SCHNABEL R. D.; TAYLOR J. F.; ALLAN M. F.; HEATON M. P.; O'CONNELL J.; MOORE S.S; SMITH T. P., SONSTEGARD T. S.; VAN TASSELL C. P. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **PLoS One**, v.4:e5350, 2009.

McCARTHY, M. I.; ABECASIS, G. R.; CARDON, L. R.; GOLDSTEIN, D. B.; LITTLE, J.; IOANNIDIS, J. P. A.; HIRSCHHORN, J. N. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nature Reviews**, v.9, p.356-369.

MCKAY, S. D.; SCHNABEL, R. D.; MURDOCH, B. M.; MATUKUMALLI, L. K.; AERTS, J.; WOUTER COPPIETERS, W.; CREWS, D.; DIAS NETO, E.; GILL, C. A.; GAO, C.; MANNEN, H.; STOTHARD, P.; WANG, Z.; VAN TASSELL, C.P.; WILLIAMS, J. L.; TAYLOR, J. F.; MOORE, S. S. Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. **BMC Genetics**, v.8, p.74, 2007.

McRAE, A. F.; McEwan, J. C.; DODDS, K. G.; WILSON, T.; CRAWFORD, A. M.; SLATE, J. Linkage disequilibrium in domestic sheep. **Genetics**, v.160, p.1113-1122, 2002.

MEUWISSEN, T. H. E.; GODDARD, M. E. Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. **Genetics**, v.155, p.421-430, 2000.

MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. **Genetics**, v.157, p.1819-1829, 2001.

MILLER, S.; LU, D.; VOORT, G. V.; SARGOLZAEI, M.; CALDWELL, T.; WANG, Z.; MAH, J.; PLASTOW, G.; MOORE, S. Beef tenderness QTL on BTA25 from a whole genome scan with the Bovine SNP50 BeadChip. In: 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 1 to 6 of august of 2010, Leipzig. **Proceedings of 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 2010. CD ROM.

NALAILA, S. M.; STOTHARD, P.; MOORE, S. S.; LI, C.; WANG, Z. Whole-genome QTL scan for ultrasound and carcass merit traits in beef cattle using Bayesian shrinkage method. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.129, p.107-119, 2011.

NCBI – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, US National Library of Medicine. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2013.

ODANI, M.; NARITA, A.; WATANABE, T.; YOKOUCHI, K.; SUGIMOTO, Y.; FUJITA, T.; OGUNI, T.; MATSUMOTO, M.; SASAKI, Y. Genome-wide linkage disequilibrium in two Japanese beef cattle breeds. **Animal Genetics**, v.37, p.139-144, 2006.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.2766–2770, 1989.

PETERS, S. O.; KIZILKAYA, K.; GARRICK, D. J.; FERNANDO, R. L.; REECY, J. M.; WEABER, R. L.; SILVER, G. A.; THOMAS, M. G. Bayesian genome wide association analyses of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. **Journal of Animal Science**, 2012.

PLATTER, W. J.; TATUM, J. D.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, J. C. Effects of repetitive use of hormonal implants on beef carcass quality, tenderness, and consumer ratings of beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.81, p.984–996, 2003.

PRITCHARD, J. K.; PRZEWORSKI, M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. **American Journal of Human Genetics**, v.69, p.1–14, 2001.

QANBARI, S.; PIMENTEL, E. C. G.; TETENS, J.; THALLER, G.; LICHTNER, P.; SHARIFI, A. R.; SIMIANER, H. The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. **Animal Genetics**, v.41, p.346-356, 2010.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, versão 2.15, 2012, disponível em: <http://www.R-project.org>.

REICH, D. E.; LANDER, E. S. On the allelic spectrum of human disease. **Trends in Genetics**, v.17, p.502-10, 2001.

SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S.; JANSEN, G. B.; SCHAEFFER, L. R. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.2106-2117, 2008.

SCHENKEL, F.S.; MILLER, S.P.; MOORE, S.S.; LI, C.; FU, A.; LOBO, S.; MANDELH, I.B.; WILTON, J.W. Association of SNPs in the leptin and leptina receptor genes with different fat depots in beef cattle. **8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Belo Horizonte, MG, 2006.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v.5, p. 63-69, 2004.

SCHREIWEIS, M. A.; HESTER, P. Y.; MOODY, D. E. Identification of quantitative trait loci associated with bone traits and body weight in an F2 resource population of chickens. **Genetics Selection Evolution**, v.37, p.677-698, 2005.

SILVA, C. R.; NEVES, H. H. R.; QUEIROZ, S. A.; SENA, J. A. D.; PIMENTEL, E. C. G. Extent of linkage disequilibrium in Brazilian Gyr dairy cattle based on genotypes of AI sires for dense SNP markers. In: **9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Leipzig, Alemanha. Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2010.

SNELLING, W. M.; ALLAN, M. F.; KEELE, J. W.; KUEHN, L. A.; McDANELD, T.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; THALLMAN, R. M.; BENNETT, G. L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.837-848, 2010.

SOLBERG, T. R.; SONESSON, A. K.; WOOLLIAMS, J. A.; MEUWISSEN, T. H. E. Genomic selection using different marker types and densities. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2447-2454, 2008.

SOLLER, M.; WEIGEND, S.; ROMANOV, M. N.; DEKKERS, J. C.; LAMONT, S. J. Strategies to assess structural variation in the chicken genome and its associations with biodiversity and biological performance. **Poultry Science**, v.85, p.2061–2078, 2006.

TATUM, J. D.; BELK, K. E.; GEORGE, M. H.; SMITH, G. C. Identification of quality management practices to reduce the incidence of retail beef tenderness problems: Development and evaluation of a prototype quality system to produce tender beef. *Journal of Animal Science*, v.77, p.2112–2118, 1999.

TENESA, A.; NAVARRO, P.; HAYES, B. J.; DUFFY, D. L.; CLARKE, G. M.; GODDARD, M. E.; VISSCHER, P. M. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. **Genome Research**, v.17, p.520-526, 2007.

VALDAR, W.; SOLBERG, L. C.; GAUGUIER, D.; BURNETT, S.; KLENERMAN, P.; COOKSON, W. O.; TAYLOR, M. S.; RAWLINS, J.N.; MOTT, R.; FLINT, J. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. **Nature Genetics**, v.38, n.8, p.879-887, 2006.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.275-305, 2002.

VILLA-ANGULO, R.; MATUKUMALLI, L. K.; GILL, C. A.; CHOI, J.; VAN TASSELL, C. P.; GREFENSTETTE, J. J. High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. **BMC Genetics**, v.10, p.19, 2009.

WEISS, K. M.; CLARK, A. G. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends Genetics**, v.18, p.19-24, 2002.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. **Clay Center: Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA**, 7p., 1995.

YAN, J.; SHAH, T.; WARBURTON, M. L.; BUCKLER, E. S.; MCMULLEN, M. D.; CROUCH, J. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. **PLoS One**, 4:e8451, 2009.

YOKOO, M. J. I.; ALBUQUERQUE, L. G.; LOBO, R. B.; SAINZ, R. D.; CARNEIRO JÚNIOR, J. M.; BEZERRA, L. A. F.; ARAUJO, F. R. C. Estimativas de parâmetros genéticos para altura do posterior, peso e circunferência escrotal em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1761-1768, 2007.

ZHANG, H.; WANG, Z.; WANG, S.; LI, H. Progress of genome wide association study in domestic animals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.3, p.26, 2012a.

ZHANG, L.; MICHAL, J. J.; O'FALLON, J. V.; PAN, Z.; GASKINS, C. T.; REEVES, J. J.; BUSBOOM, J. R.; ZHOU, X.; DING, B.; DODSON, M. V.; JIANG, Z. Quantitative genomics of 30 complex phenotypes in Wagyu x Angus F₁ progeny. **International Journal of Biological Sciences**, v.8, p.838-858, 2012b.