UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

HERDABILIDADE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE CARACTERÍSTICAS DE EMISSÃO DE METANO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Luana Lelis Souza
Genética e Melhoramento Animal

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

HERDABILIDADE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE CARACTERÍSTICAS DE EMISSÃO DE METANO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Discente: Luana Lelis Souza
Orientador: Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva
Coorientadora: Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

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

2023

S729h

Souza, Luana Lelis
Herdabilidade e estudo de associação genômica de características de emissão de metano em bovinos da raça Nelore / Luana Lelis Souza. -- Jaboticabal, 2023
50 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva
Coorientadora: Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

1. Consumo de alimentos. 2. Ganho de peso. 3. Gases de efeito estufa. 4. Genetica animal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: HERDABILIDADE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE CARACTERÍSTICAS DE EMISSÃO DE METANO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

AUTORA: LUANA LELIS SOUZA
ORIENTADOR: JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA
COORIENTADORA: MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Genética e Melhoramento Animal, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCEL
Data: 23/03/2023 20:05:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA (Participaçao Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutricao Animal / FMVZ UNESP Bo

Documento assinado digitalmente
LENIRA EL FARO ZADRA
Data: 15/03/2023 11:42:50-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA (Participaçao Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Documento assinado digitalmente
NEDENIA BONVINO STAFUZZA
Data: 13/03/2023 13:54:26-0300
Verifique em https://verificador.iti.br

Pesquisadora Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA (Participaçao Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Documento assinado digitalmente
HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Data: 15/03/2023 11:58:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
MATHEUS DENIZ
Data: 13/03/2023 20:59:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. MATHEUS DENIZ (Participaçao Virtual)
Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 13 de março de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luana Lelis Souza, nasceu 10 de maio de 1992 em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 2012 ingressou no curso de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (PUC/CESJF), Juiz de Fora, Minas Gerais. Durante a graduação foi bolsista pela FAPEMIG na EMBRAPA Gado de Leite no laboratório de Melhoramento e Genética Animal sob orientação do Dr. Frank Angelo Tomita Bruneli, com monografia intitulada “Fatores que afetam a longevidade de vacas leiteiras da raça Guzerá”. Em 2016, iniciou o Mestrado em Produção Animal Sustentável no Instituto de Zootecnia em Sertãozinho, São Paulo. Sob orientação da Prof. Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante defendeu a dissertação “Eficiência alimentar e perfil metabólico de matrizes Nelore em lactação”. Em 2018, foi bolsista de Bolsista de Treinamento Técnico III pela FAPESP no Instituto de Zootecnia em Sertãozinho, São Paulo. Em 2019, ingressou no Doutorado Genética e Melhoramento Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) em Jaboticabal, São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Josineudson Augusto II Vasconcelos da Silva e da Prof. Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante.

“É preciso tentar não sucumbir sob o peso de nossas angústias, e continuar a lutar.”

(Alvo Dumbledore)

AGRADECIMENTOS

À minha namorada Juliana que esteve comigo sempre me incentivando e me dando forças, e por entender minha ausência nos momentos necessários.

Ao meu pai Hercules por todo apoio e suporte, as minhas Paula e Hélida que mesmo estando longe estiveram sempre do meu lado me incentivando, aos meus sobrinhos Gabriel, Maria Julia, Davi e Iasmim pelos momentos de distração e alegria. A minha mãe Maria das Graças que mesmo não estando mais aqui tenho certeza de que esteve sempre olhando por mim durante todo este processo.

Ao meu orientador Augusto por toda ajuda, paciência e conhecimento, à minha coorientadora Drª Maria Eugênia pela confiança e todo aprendizado.

À minha equipe de projeto, estagiários, mestrandos e bolsistas, pela grande ajuda principalmente ao Leandro, por todo o conhecimento, ajuda e parceria durante toda a parte prática.

Aos campeiros e funcionários do Instituto de Zootecnia por toda ajuda durante o experimento.

A todos do Instituto de Zootecnia e da UNESP/FCAV que me ajudaram direta ou indiretamente.

A todos os docentes da Pós-Graduação da UNESP/FCAV pelo crescimento científico.

À FAPESP por suporte financeiro (Proc 2017/10630-2 e Proc 2017/50339-5) e por financiar a bolsa de doutorado (Proc 2019/11738-7).

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e finalização desse trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais 1

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2

2.1 Emissão de metano 2

2.2 Relação da eficiência alimentar e emissão de metano 4

2.3 Herdabilidade 5

2.4 Estudos de associação genômica ampla 5

REFERÊNCIAS 7

CAPÍTULO 2 – Estimativas de herdabilidade e estudo de associação genômica para características de emissão de metano em bovinos da raça Nelore 11

1. INTRODUÇÃO 11

2. OBJETIVOS 12

2.1 Objetivo geral 12

2.2 Objetivos específicos 12

3. MATERIAL E MÉTODOS 12

3.1 Local e animais 12

3.3 Características de desempenho 14

3.4 Características relativas à emissão de metano 15

3.5 Arquivos de genótipos 18

3.6 Análises genéticas 19

3.6.1 Estimativa de herdabilidade e estudo de associação genômica 19

4. RESULTADOS 20

4.1 Estimativa de herdabilidade 21

4.2 Estudo de associação genômica **22**
4.2.1 Emissão de metano 22
4.2.2 Emissão de metano por consumo de matéria seca 23
4.2.3 Emissão de metano por ganho médio diário 25
4.2.4 Emissão de metano para peso vivo médio 27
4.2.5 Emissão de metano residual 29
5. DISCUSSÃO **31**
6. CONCLUSÃO **35**
REFERÊNCIAS **36**

HERDABILIDADE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DE CARACTERÍSTICAS DE EMISSÃO DE METANO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO - A seleção genética para reduzir a emissão de metano (CH_4) por ruminantes é uma estratégia para mitigar o CH_4 porque as melhorias são cumulativas e permanentes ao longo das gerações. O objetivo deste estudo foi estimar a herdabilidade e realizar o estudo de associação genômica das características de emissão de CH_4 em bovinos da raça Nelore. Os dados foram coletados em dois programas de melhoramento genético (Instituto de Zootecnia (IZ) e Qualitas). Os animais foram avaliados em testes de eficiência alimentar. As dietas consistiram em 60% de volumoso e 40% de concentrado. O metano foi avaliado em 751 Nelore (48 fêmeas do IZ, 564 machos do IZ e 139 machos do Qualitas), por cinco dias consecutivos, por meio da técnica de hexafluoreto de enxofre como gás traçador. Foram analisadas a emissão de metano em g/dia (CH_4gd), emissão de metano por kg de CMS (CH_4CMS), emissão de metano residual (CH_4R), emissão de metano por kg de peso vivo médio (CH_4PVM) e emissão de metano por ingestão média diária (CH_4GMD). Os dados foram analisados ajustando um modelo animal univariado com o efeito fixo de grupo de amostragem, idade inicial na coleta de CH_4 como covariável, bem como os efeitos aleatórios de animal e erro. Foram incluídos nesse estudo informações fenotípicas das características de emissão de metano de 743 animais, além de genótipos oriundos de 6.239 animais genotipados. O número total de SNPs utilizados nas análises de associação genômica ampla com os genótipos após a imputação foi de 407.213. O arquivo de pedigree com 18.352 animais foi incluído na análise. A identificação dos genes foi realizada no BioMart/Ensembl (genoma bovino ARS-UCD1.2). A estimativa de herdabilidade foi de 0,39 para CH_4gd, 0,20 para CH_4CMS, 0,36 para CH_4GMD, 0,06 para CH_4PVM, 0,20 para CH_4R. A janela 39697429 - 40695738 do cromossomo 20 teve uma grande participação na explicação da variância aditiva na maioria das características de emissão de metano (CH_4gd, CH_4CMS, CH_4PVM e CH_4R). Vários genes associados com a emissão de metano foram encontrados, como C1QTNF3, ACBD5, ADAMTS12, ANGPTL2, OSMR, NOS1, ERCC5, COL14A1. Os genes estão associados com deposição de gordura, peso de carcaça, crescimento e desenvolvimento, eficiência alimentar, estresse térmico, qualidade da carne, marmoreio. O valor da estimativa de herdabilidade para a característica emissão de metano demonstra o potencial de seu uso como critério de seleção em programas de melhoramento genético animal. Em conclusão, as características relativas a emissão de metano podem ser incluídas em programas de melhoramento animal.

Palavras-chave: consumo de alimentos, ganho de peso, gases de efeito estufa, genética animal

HERITABILITY AND STUDY OF GENOMIC ASSOCIATION OF METHANE EMISSION TRAITS IN NELORE CATTLE

ABSTRACT – Genetic selection to reduce methane emissions (CH4) by ruminants is a strategy to mitigate CH_4 because the improvements are cumulative and permanent over generations. The objective of this study was to estimate the heritability and perform the genomic wide association study of CH_4 emission traits in Nellore cattle. Data were collected in two genetic improvement programs (Instituto de Zootecnia (IZ) and Qualitas). The animals were evaluated in feed efficiency tests. Diets consisted of 60% roughage and 40% concentrate. Methane was evaluated in 751 Nelore (48 females from the IZ, 564 males from the IZ and 139 males from the Qualitas), for five consecutive days, using the flux hexafluoride technique as a tracer gas. Methane emissions in g/day (CH_4gd), methane emissions per kg of DMI (CH_4CMS), residual methane emissions (CH_4R), methane emissions per kg of average live weight (CH_4PVM) and methane emissions per average daily intake (CH_4ADG). Data were analyzed by fitting a univariate animal model with the fixed effect of accelerator group, initial age at CH_4 collection as a covariate, as well as the random effects of animal and error. This study included phenotypic information on the methane emission traits of 743 animals, in addition to genotypes originating from 6,239 genotyped animals. The total number of SNPs used in genomic-wide association analyzes with genotypes after imputation was 407,213. The pedigree file with 18,352 animals was included in the analysis. Gene identification was performed using BioMart/Ensembl (bovine genome ARS-UCD1.2). The estimate of heritability was 0.39 for CH_4gd, 0.20 for CH_4CMS, 0.36 for CH_4GMD, 0.06 for CH_4PVM, 0.20 for CH_4R. The window 39697429 - 40695738 of chromosome 20 had a great participation in explaining the additive variance in most methane emission characteristics (CH_4gd, CH_4CMS, CH_4PVM and CH_4R). Several genes associated with methane emission were found, such as C1QTNF3, ACBD5, ADAMTS12, ANGPTL2, OSMR, NOS1, ERCC5, COL14A1. Genes are associated with fat deposition, carcass weight, growth and development, feed efficiency, heat stress, meat quality, marbling. The value of the heritability estimate for the methane trait emission demonstrates its potential use as a selection option in animal genetic improvement programs. In conclusion, traits related to methane emissions can be included in animal breeding programs.

Keywords: food intake, body weight, greenhouse gases, animal genetics

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A emissão de metano entérico (CH_4) é processo natural em ruminantes que pode resultar em perdas de 2 a 12% da energia total consumida pelo animal (Johnson e Johnson, 1995). Essa variação pode ser explicada por alguns fatores como o nível de ingestão, a composição química da dieta e por fatores genéticos (Donogue et al., 2016; Warner et al., 2017).

A emissão do metano entérico por ruminantes contribui com aproximadamente 6% das emissões antropogênicas globais de gases de efeito estufa. Assim, os produtores precisam de maneiras econômicas para reduzir as emissões e, ao mesmo tempo, atender à demanda dos consumidores por alimentos de alta qualidade, seguros e acessíveis, produzidos a partir de animais saudáveis (Beauchmin et al., 2020).

A seleção genética é uma estratégia para mitigar o CH_4, porque as melhorias são cumulativas e permanentes ao longo das gerações. As estimativas de herdabilidade são necessárias para prever os valores genéticos para CH_4 ao longo das gerações.

Várias tecnologias promissoras, como métodos de seleção genética, têm um grande potencial na redução das emissões de metano. A detecção de variantes genéticas do genoma é realizada por meio de associações estatísticas entre a caraterística de interesse e SNPs conhecido como estudo de associação genômica, com isto é possível identificar variantes genéticas associadas às diferenças fenotípicas da característica em uma população (Visscher et al., 2017).

Como as características de emissão de metano são de difícil mensuração e há pouca informação científica sobre a variação genética destas características, espera-se que estimativas de parâmetros genéticos e das variantes genéticas associadas a estas características favoreçam a implementação da seleção para redução da emissão de metano pelos bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Emissão de metano

O setor pecuário desempenha papel importante na produção de alimentos, em consequência, contribui com emissões mundiais estimadas em 7,1 gigatoneladas de $CO_{2\text{-eq}}$ por ano, ou seja, 14,5% das emissões dos gases de efeito estufa (GEE) produzidas pelo homem (FAO, 2017), que ocasionam as mudanças climáticas. Os bovinos são responsáveis por aproximadamente 4,6 gigatoneladas de $CO_{2\text{-eq}}$, onde é um dos principais contribuintes para as emissões no setor agropecuário. As principais fontes de emissão de metano são a produção, o processamento de alimentos e a fermentação entérica dos ruminantes, os quais representam 45 e 40%, respectivamente, das emissões (Garnsworthy et al., 2019).

O grande desafio da pecuária é aumentar a produção de alimentos (projetado para +70% entre 2005 e 2050), que é impulsionada pelo crescimento da população mundial (9,6 mil milhões até 2050) e pelo aumento da riqueza e urbanização (FAO, 2017), sem aumentar as emissões de GEE, ou mesmo, diminuí-las. Por meio de tecnologias e práticas que melhoram a eficiência da produção animal é possível reduzir as emissões de GEE. Várias tecnologias promissoras, tais como aditivos alimentares, vacinas e métodos de seleção genética, têm grande potencial para conseguir alcançar este objetivo (Lasse, Difford, 2020).

A produção de metano é impulsionada principalmente pelo consumo de matéria seca e pela fermentação do alimento, de modo que as emissões flutuam a longo prazo e variam de acordo com o estado do animal, da dieta e do momento da alimentação. Obter estimativas precisas e de baixo custo da produção de metano para determinado grupo de animais em condições comerciais é um desafio, principalmente por ser um método caro de avaliação, trabalhoso, requer mão de obra e equipamentos especializados, e por isso seria necessário realizar várias coletas ao longo dos anos (Beauchemin et al., 2020).

Características relativas à emissão de metano entérico podem ser definidas de várias formas e serem incluídas em programas de melhoramento genético de bovinos de corte. As características são: emissão de metano (CH_4 l/dia ou g/dia), rendimento

de metano (CH_4/consumo de matéria seca), intensidade de emissão de metano (g CH_4/kg de ganho em peso), emissão de metano por consumo de matéria seca (g/kg/dia), emissão de metano por ganho médio diário (g/kg/dia), emissão de metano por peso vivo médio (g/kg) e aquelas definidas como resíduo com base na regressão genética ou fenotípica de metano sobre o consumo de matéria seca (g/dia). Essas características relativas têm sido avaliadas quanto a estimativas de herdabilidade e correlações fenotípicas e genéticas com características de desempenho, como consumo de matéria seca, características de crescimento e de carcaça (Herd et al., 2014; Donoghue et al., 2016; Manzanilla-Pech et al., 2016).

Os resultados preliminares obtidos para bovinos de corte, coletados em apenas dois bancos de dados, descrevem estimativa de herdabilidade maior para CH_4 e menor para as características definidas como resíduo, o que tem sido sugerido ao fato do CH_4 (g/dia) ter alta correlação genética com o consumo de matéria seca (0,71) e com características de crescimento (0,79 a 0,86) (Herd et al., 2014; Donoghue et al., 2016; Manzanilla-Pech et al., 2016).

Existem alguns métodos de mensurar a emissão de metano em bovinos. As câmeras respirométricas são consideradas eficazes, mas possuem um alto custo e, como só é possível ter um animal por vez na câmera respirométrica, esse método faz com que não consiga mensurar o metano de muitos animais. Assim, outros métodos ganharam popularidade, por exemplo, cangas (Difford et al., 2019), gás traçador hexafluoreto de enxofre (Hammond et al., 2015, Garnsworthy et al., 2019) e um sistema automatizado (GreenFeed, C-lock Inc., Garnsworthy et al., 2019), os quais permitiram assim a mensuração da emissão de metano em um número maior de animais por dia e em diferentes condições.

A técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6) é utilizada extensivamente na Nova Zelândia, Canadá, Austrália e Estados Unidos, e em países do norte europeu como Suécia e Noruega, foi desenvolvida por Zimmerman (1993) e implantada por Johnson et al. (1994). A ideia deste método é utilizar um gás traçador, para mensurar a emissão de metano, que não seja tóxico, que seja fisiologicamente inerte e estável, e que se mistura com gases no rúmen da mesma maneira que o metano faz.

Esta técnica possibilita estimar a emissão de metano de mais indivíduos em seu ambiente natural, sem a necessidade de confiná-los em piquetes individuais. No estudo de Deighton et al. (2014) foram identificados e corrigidos erros substanciais onde validaram a técnica por meio da comparação das emissões estimadas por esta técnica modificada do gás traçador SF_6 e por câmera respirométrica. Não houve diferença entre as estimativas de emissão de metano obtidas por SF_6 e por câmeras respirométricas, e o coeficiente de variação (cerca de 7%) foi similar para as duas técnicas, sugerindo que a técnica modificada do gás traçador SF_6 é um método com acurácia próxima às obtidas nas câmeras respirométricas.

2.2 Relação da eficiência alimentar e emissão de metano

A redução das emissões de metano de forma mais eficiente pode ser obtida pela escolha de características fortemente correlacionadas com os níveis de emissão de metano, e consumo alimentar residual (CAR), ao invés de características de produção, dado que as emissões de metano são relacionadas ao consumo de alimentos (Hayes et al., 2013).

A incorporação de medidas de eficiência alimentar em programas de seleção multicaracterísticas tem o potencial de reduzir a quantidade de ração utilizada para a produção de carne e leite (menor consumo de matéria seca com alteração mínima na digestibilidade). Consequentemente, é esperada diminuição nas emissões absolutas de metano entérico com maior eficiência alimentar (Beauchemin et al., 2020, Sakamoto et al., 2021). No entanto, ainda existem inconsistências entre os resultados da relação entre eficiência alimentar e emissão de metano entérico pelos bovinos. Alguns estudos sugerem que a emissão de metano entérico individual pode aumentar em animais mais eficientes (Jones et al., 2011; Freetly e Brown-Brandl, 2013; Mercadante et al., 2015; Velazco et al., 2016). Até o momento não há estimativas de correlação genética entre emissão de metano entérico e características de eficiência alimentar publicadas em bovinos, com exceção de correlações envolvendo estimativas de emissão de metano entérico (onde a emissão de metano é estimada através de uma equação, então depende diretamente de outras características de desempenho) e não a medida da emissão propriamente dita.

2.3 Herdabilidade

A herdabilidade constitui importante parâmetro genético que expressa a proporção da variância fenotípica que é atribuída aos efeitos aditivos dos genes de uma característica, numa determinada população (Falconer e Mackay, 1996). A seleção genética para uma característica tem o potencial de promover mudanças, porque o efeito é cumulativo e duradouro (Lassen e Difford, 2020).

As estimativas de herdabilidade de medidas de emissão de metano entérico são de magnitude moderada, de 0,21 a 0,50 (Difford et al., 2019, Uemoto et al., 2020, Richardson et al., 2021, Ghavi Hossein-Zadeh et al., 2022) o que possibilita o ganho genético por meio da seleção. Entretanto, a sua mensuração é difícil e de alto custo.

2.4 Estudos de associação genômica ampla

O desenvolvimento de tecnologias de genotipagem e sequenciamento possibilitaram disponibilizar ao mercado painéis de alta densidade de marcadores do tipo SNP espalhados por todo o genoma. As informações obtidas em nível molecular por meio destes painéis podem ser utilizadas na estimação de parâmetros genéticos e avaliação genética por meio da inclusão da matriz de parentesco genômica (*single-step* genomic BLUP). Com essa estimação das relações genéticas, é possível observar melhora entre os animais e a estimação dos parâmetros genéticos (Lemos et al., 2016), bem como os valores genéticos genômicos estimados que podem ser utilizados em estudos de associação de características de importância econômica.

Informações dos marcadores SNP também podem ser utilizadas em estudos de associação genômica ampla (GWAS – Genome-Wide Association Study), onde é possível a detecção de associações estatísticas entre a característica de interesse e os marcadores SNP, de forma a identificar possíveis variações genéticas associadas às diferenças fenotípicas da característica em uma população (Liu et al., 2013; Visscher et al., 2017).

Na pecuária, o GWAS ganhou popularidade no mapeamento de QTL para características de interesse econômico. Devido à diferença da arquitetura genética entre as raças e devido à natureza poligênica das características complexas são identificadas diferentes regiões e genes associados a uma mesma característica, em

diferentes populações da mesma raça apresentam resultados diferentes (Sharma et al., 2015).

Há poucos estudos de associação genômica ampla com características relativas à emissão de metano em bovinos. Manzanilla-Pech et al. (2016) realizaram estudo com animais da raça Angus, e concluíram, por meio de análise de GWAS e estimativas de parâmetros genéticos, que a emissão de metano é característica dependente do consumo de matéria seca e do peso do animal no teste de desempenho, e que a emissão de metano pode ser característica a ser incluída em programas de melhoramento genético se o consumo de matéria seca e o peso do animal no teste também estiverem incluídos no processo de seleção.

No estudo de Calderón-Chagoya et al. (2019) realizado com bovinos de leite, foram encontrados vários SNPs associados ao metano estimado através da produção de leite, que estão em regiões previamente descritas para QTLs associados a características de composição da carne, ácidos graxos do leite e características relacionadas ao consumo alimentar.

De acordo com Sarghale et al. (2020) que realizaram um estudo com vacas da raça Holandesa, através de GWAS, os SNPs encontrados foram próximos aos QTLs para produção de leite e seus componentes, peso corporal e consumo alimentar residual. Manzanilla-Pech et al. (2022) analisaram, em vacas da raça Holandesa, a concentração de metano por meio de GWAS e verificaram associações com regiões de QTL previamente relatadas para a produção de leite, mantença e características de eficiência alimentar.

Como as características de emissão de metano são de difícil mensuração e há pouca informação científica sobre a variação genética dessas características, espera-se que estimativas de parâmetros genéticos e das variantes genéticas associadas a estas características favoreçam a implementação da seleção para redução da emissão de metano pelos bovinos.

REFERÊNCIAS

Basarab JA, Beauchemin KA, Baron VS, Ominski KH, Guan LL, Miller SP, Crowley JJ (2013) Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. **Animal** 7:303-315.

Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Eckard RJ, Wang M (2020) Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. **Animal** 14:s2-s16.

Calderón-Chagoya R, Hernandez-Medrano JH, Ruiz-López FJ, Garcia-Ruiz A, Vega-Murillo VE, Montano-Bermudez M, Román-Ponce SI (2019) Genome-wide association studies for methane production in dairy cattle. **Genes**, 10:995.

Deighton MH, Williams SRO, Hannah MC, Eckard RJ, Boland TM, Wales WJ, Moate PJ (2014) A modified sulphur hexafluoride tracer technique enables accurate determination of enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology** 197:47–63.

Difford GF, Olijhoek DW, Hellwing ALF, Lund P, Bjerring MA, De Haas Y, Løvendahl P (2019) Ranking cows' methane emissions under commercial conditions with sniffers versus respiration chambers. **Acta Agriculturae Scandinavica**, 68:25-32.

Donoghue KA, Bird-Gardiner T, Arthur PF, Herd RM, Hegarty RF (2016) Genetic and phenotypic variance and covariance components for methane emission and postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science** 94:1438-1445.

Falconer IR (1996) Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. **Phycologia,** 35:6-11.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The future of food and agriculture - trends and challenges. In The future of food and agriculture: trends and challenges, 2017.

Freetly HC e Brown-Brandl TM (2013) Enteric methane production from beef cattle that vary in feed efficiency. **Journal of Animal Science** 91:4826–4831.

Garnsworthy PC, Difford GF, Bell MJ, Bayat AR, Huhtanen P, Kuhla B, Yan T (2019) Comparison of methods to measure methane for use in genetic evaluation of dairy cattle. **Animals** 9:837.

Ghavi Hossein-Zadeh N (2022) Estimates of the genetic contribution to methane emission in dairy cows: a meta-analysis. **Scientific Reports** 12.

Goddard ME, Wray NR, Verbyla K, Visscher PM (2009) Estimating effects and making predictions from genome-wide marker data. **Statistical Science** 24:517-529.

Hammond KJ, Humphries DJ, Crompton LA, Green C, Reynolds CK (2015) Methane emissions from cattle: Estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. **Animal Feed Science and Technology** 203:41-52.

Hayes BJ, Lewin HA, Goddard ME (2013) The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. **Trends in genetics**, 29:206-214.

Herd RM, Arthur PF, Donoghue KA, Bird SH, Bird-Gardiner T, Hegarty RS (2014) Measures of methane production and their phenotypic relationships with dry matter intake, growth, and body composition traits in beef cattle. **Journal of Animal Science** 92:5267-5274.

Johnson K, Huyler M, Westberg H, Lamb B, Zimmerman P (1994) Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF_6 tracer technique. **Environmental Science & Technology** 28:359-362.

Jones FM, Phillips FA, Naylor T, Mercer NB (2011) Methane emissions from grazing Angus beef cows selected for divergent residual feed intake. **Animal Feed Science and Technology** 166:302-307.

Kenny DA, Fitzsimons C, Waters SM, McGee M (2018) Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle–the current state of the art and future challenges. **Animal** 12:1815-1826.

Lassen J e Difford GF (2020) Genetic and genomic selection as a methane mitigation strategy in dairy cattle. **Animal** 14:s473-s483.

Lemos MVA, Chiaia HLJ, et al. (2016) Genome-wide association between single nucleotide polymorphisms with beef fatty acid profile in Nellore cattle using the single step procedure. **BMC Genomics** 17.

Liu R, Sun Y, Zhao G, Wang F, Wu D, Zheng M, Chen J, Zhang L, Hu Y, Wen J (2013) Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for body composition and meat quality traits in beijing-you chickens **PLOS ONE**, 8:e61172.

Manzanilla-Pech, CIV, De Haas, Y, Hayes, BJ, Veerkamp, RF, Khansefid, M, Donoghue, KA, Arthur, PF, Pryce, JE (2016) Genomewide association study of methane emissions in Angus beef cattle with validation in dairy cattle. **Journal of Animal Science** 94:4151-4166.

Manzanilla-Pech, CIV, Difford, GF, Sahana, G, Romé, H, Løvendahl, P, Lassen, J (2022). Genome-wide association study for methane emission traits in Danish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science** 105:1357-1368.

Mercadante, MEZ, Caliman, APDM, Canesin, RC, Bonilha, SFM, Berndt, A, Frighetto, RTS, Magnani, E, Branco, R (2015) Relationship between residual feed intake and enteric methane emission in Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia** 44:255-262.

Richardson, CM, Nguyen, TTT, Abdelsayed, M, Moate, PJ, Williams, SRO, Chud, TCS, Pryce, JE (2021) Genetic parameters for methane emission traits in Australian dairy cows. **Journal of Dairy Science** 104:539-549.

Sakamoto, LS, Souza, LL, Gianvecchio, SB, de Oliveira, MHV, Silva, JAIDV, Canesin, RC, Mercadante, MEZ (2021) Phenotypic association among performance, feed efficiency and methane emission traits in Nellore cattle. **Plos one** 16:e0257964.

Sharma, A, Lee, JS, Dang, CG, Sudrajad, P, Kim, HC, Yeon, SH, Lee, SH (2015). Stories and challenges of genome wide association studies in livestock - a review. **Asian-Australasian journal of animal sciences** 28:1371.

Uemoto, Y, Takeda, M, Ogino, A, Kurogi, K, Ogawa, S, Satoh, M, Terada, F (2020) Genetic and genomic analyses for predicted methane-related traits in Japanese Black steers. **Animal Science Journal** 91:e13383.

Velazco, JI, Herd, RM, Cottle, DJ, Hegarty, RS (2016) Daily methane emissions and emission intensity of grazing beef cattle genetically divergent for residual feed intake. **Animal Production Science** 57:627-635.

Visscher, PM, Wray, NR, Zhang, Q, Sklar, P, Mccarthy, MI, Brown, MA, Yang, J (2017) 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. **The American Journal of Human Genetics** 101:5-22.

Zimmerman, P.R. System for Measuring Metabolic Gas Emissions from Animals (1993) In: U.S. Patent and trademark office (Ed.), United States, Pat. No. 5, 265, 618, p. 11.

CAPÍTULO 2 – Estimativas de herdabilidade e estudo de associação genômica para características de emissão de metano em bovinos da raça Nelore

1. INTRODUÇÃO

O metano entérico de ruminantes é responsável por parte das emissões globais de gases de efeito estufa, onde contribui com aproximadamente metade de todas as emissões agrícolas, os bovinos são responsáveis pela maior fonte de metano entérico da agricultura (FAOSTAT, 2020). As características de produção de metano, que são mensuradas como a proporção de energia perdida da dieta, são globalmente sugeridas para mitigar o metano (CH_4) dos bovinos e são indicadores importantes para a eficiência alimentar (Pörtner et al., 2022).

A seleção genética é uma estratégia para mitigar o CH_4, porque os ganhos genéticos são cumulativos e permanentes ao longo das gerações, sendo importante não apenas para aumento da produtividade do gado de corte, mas também para a redução da quantidade total de emissão de metano (Uemoto et al., 2020).

As estimativas de herdabilidade são essenciais para predizer os valores genéticos para a emissão de metano. As informações das estimativas de parâmetros genéticos e a identificação de regiões de QTL também podem ser úteis no melhoramento genético para características relacionadas ao metano em bovinos de corte (Donoghue et al., 2016; Hayes et al., 2016; Uemoto et al., 2020).

Uma estratégia para programas de melhoramento genético seria a combinação de características relacionadas ao metano, carcaça e eficiência alimentar, pois essas características são importantes para aumentar a produtividade e reduzir os gases de efeito estufa em bovinos de corte (Uemoto et al., 2020). Espera-se que a obtenção de estimativas de parâmetros genéticos para estas características ajude na implementação da seleção genética para redução da emissão de metano nos bovinos de corte.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar as características relativas à emissão de metano entérico (Emissão de metano em g/dia, CH_4 por kg de consumo de matéria seca, CH_4 por kg de peso corporal no meio do teste, CH_4 por ganho médio diário e CH_4 residual) em animais da raça Nelore.

2.2 Objetivos específicos

a) Estimar os coeficientes de herdabilidade das características relativas à emissão de metano entérico.

b) Realizar estudo de associação genômica ampla das características de emissão de metano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e animais

O experimento foi conduzido nos anos 2011, 2012, 2018, 2019, 2020 e 2021, no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica dos Agronegócios (APTA) de Bovinos de Corte, órgão do Instituto de Zootecnia do Estado de São Paulo (IZ), localizado em Sertãozinho, São Paulo, Brasil. E também, mensurações foram realizadas nos anos 2019 e 2021, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/FMVZ em parceria com o Programa Qualitas, localizado em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações das Diretrizes de Bem-Estar Animal e Abate Humanitário (Estado de São Paulo, Lei nº 11.977). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Zootecnia (Protocolo Número 278–19), Nova Odessa-SP, Brasil.

No programa de melhoramento genético do Instituto de Zootecnia o rebanho de bovinos da raça Nelore é composto por três linhas de seleção iniciadas em 1978: Nelore Seleção, onde a seleção é baseada no maior diferencial de seleção para peso pós desmame, Nelore Tradicional, onde a seleção é baseada no maior diferencial do peso pós desmame e consumo alimentar residual, e Nelore Controle, onde a seleção é baseada em diferencial de seleção nulo para peso pós desmame (Mercadante et al., 2003).

O Programa Nelore Qualitas iniciou suas atividades em 2001 com propriedades participantes dos Estados de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais, e utiliza índice de seleção empírico com as seguintes ponderações: 20% da diferença esperada na progênie (DEP) para peso à desmama direto, 40% da DEP para ganho de peso pós-desmama, 20% da DEP para perímetro escrotal e 20% da DEP para musculosidade.

No estudo foram avaliados 751 animais da raça Nelore, sendo 612 animais do IZ (48 fêmeas e 564 machos) e 139 animais machos do Programa Qualitas. Os animais foram submetidos a testes de desempenho de duração de 77 ± 15 dias (com 28 dias de adaptação, de acordo com Grion et al., 2014). Alguns animais ficaram em baias individuais (48 fêmeas e 47 machos) e outros em piquetes com cochos eletrônicos de alimentação (GrowSafe® (517 machos), Airdrie-AB, Canadá e Intergado® (139 machos), Contagem-MG, Brasil) para o registro automático de consumo alimentar diário individual. Os animais que ficaram nos piquetes com cochos eletrônicos foram identificados com brincos eletrônicos RFID (Radio Frequency Identification). Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* à dieta e água. Os animais foram divididos em 19 grupos de coleta, já que a emissão de metano só poderia ser coletada no máximo em 60 animais por vez (Tabela 1).

Os animais foram alimentados com dieta única em cada teste realizado. As dietas nos testes de eficiência consistiam em silagem (milho ou sorgo), feno de *Brachiaria*, bagaço de cana, farelo (algodão, soja ou amendoim), milho (grão moído ou úmido), polpa cítrica, pré-mistura mineral, sal, sulfato de amônio, e ureia. No programa IZ as dietas foram formuladas para ganho de 0,800 kg/dia em 2011 e 2012 e para ganho de 1,200 kg/dia em 2018, 2019 e 2020 e 2021, já para o programa do

Qualitas as dietas foram formuladas para ganho de 1,700 kg/dia em 2019 e 2021 (NRC, 2000).

Tabela 1. Descrição de grupos de teste para avaliação de características de emissão de metano entérico em bovinos Nelore

Grupo	Ano	Sexo	Dias em teste	Piquete	Tipo de coleta	Programa	N° de animais	Idade Inicial (dias)	Peso Inicial (kg)
1	2011	Fêmea	83	Individual	Canga	IZ	23	294	219
2	2011	Macho	71	Individual	Canga	IZ	23	268	254
3	2012	Macho	90	Individual	Canga	IZ	24	264	229
4	2012	Fêmea	85	Individual	Canga	IZ	25	325	261
5	2018	Macho	83	Growsafe	Cilindro	IZ	34	347	270
6	2018	Macho	83	Growsafe	Cilindro	IZ	36	354	275
7	2019	Macho	83	Growsafe	Cilindro	IZ	60	249	224
8	2019	Macho	56	Intergado	Cilindro	Qualitas	55	647	464
9	2019	Macho	56	Intergado	Cilindro	Qualitas	56	667	573
10	2019	Macho	83	Growsafe	Cilindro	IZ	62	329	285
11	2020	Macho	83	Growsafe	Cilindro	IZ	41	237	226
12	2020	Macho	83	Growsafe	Cilindro	IZ	42	239	221
13	2020	Macho	70	Growsafe	Cilindro	IZ	35	313	312
14	2020	Macho	70	Growsafe	Cilindro	IZ	34	309	297
15	2021	Macho	56	Intergado	Cilindro	Qualitas	22	553	514
16	2021	Macho	90	Growsafe	Cilindro	IZ	36	248	239
17	2021	Macho	90	Growsafe	Cilindro	IZ	39	246	232
18	2021	Macho	78	Growsafe	Cilindro	IZ	48	339	307
19	2021	Macho	78	Growsafe	Cilindro	IZ	48	336	302

3.3 Características de desempenho

O consumo de cada animal foi registrado diariamente. O consumo de matéria seca (CMS) foi calculado contabilizando todos os dias válidos de consumo de alimento, multiplicado pelo teor de matéria seca semanal da dieta fornecida.

O ganho de peso médio diário (GMD) foi obtido como:

$$yi = \alpha + \beta * DETi + \varepsilon i,$$

em que yi é o peso do animal na iésima observação; α é o intercepto da equação de regressão e representa o peso inicial; β é o coeficiente de regressão linear e representa o GMD; DETi é o dia em teste na iésima observação, e εi é o erro aleatório associado a cada observação.

O peso corporal metabólico ($PV^{0,75}$) foi obtido para cada período como:

$$PV^{0,75} = [\alpha + (GMD \times 0,5 \times DET)]^{0,75},$$

em que α é o intercepto da equação de regressão e representa o peso inicial e DET é dias em teste. O peso vivo médio (PVM) é o peso corporal no meio do teste. O consumo alimentar residual (CAR) foi estimado como a diferença entre o consumo observado e o consumo estimado, como descrito em Grion et al. (2014).

3.4 Características relativas à emissão de metano

A estimativa da emissão de metano entérico (CH_4 em g/dia) foi obtida para os mesmos animais descritos anteriormente, através da metodologia do gás traçador SF_6 modificada, como descrita por Deighton et al. (2014). Os tubos de permeação (cápsulas) contendo SF_6, tal como descrito por Deighton et al. (2011), foram incubados a 39°C, mantidos em temperatura de incubação constante para evitar flutuação de temperatura que afeta a taxa de liberação de SF_6 (Deighton et al., 2014). As cápsulas foram pesadas uma vez por semana no período da manhã e a massa dos tubos individuais foi determinada utilizando balança analítica calibrada com resolução de 0,1 mg. A taxa de emissão de SF_6 de cada tubo foi determinada por regressão linear de massa ao longo de 21 dias. Somente as cápsulas com taxas de liberação semelhantes de SF_6 foram selecionadas, a fim de minimizar a gama de taxa de liberação de SF_6 dentro do experimento e para assegurar que cada animal tenha recebido uma dose diária semelhante de SF_6 e, portanto, que emitirá quantidade semelhante de SF_6.

Após a determinação da taxa de liberação de SF_6 durante 21 dias, as cápsulas foram administradas aos animais, cinco dias antes do início do período de colheita do gás, para assegurar que o declínio na taxa de liberação de SF_6 dos tubos de

permeação ao longo do tempo tenha efeito negligenciável sobre a taxa prevista de liberação de SF_6 durante o período subsequente de colheita do gás (Deighton et al., 2013). A colheita do gás foi realizada em cinco períodos consecutivos de 24h, diariamente antes da primeira alimentação do dia (por volta das 7h da manhã), através de cilindros metálicos de 2 litros evacuados para 0,03 atm. O aparato de colheita foi alocado em cada animal através de um cabresto de couro e uma sela leve, e os animais foram adaptados a este aparato 14 dias antes da colheita.

A coleta dos gases (Figura 1) emitidos pelos animais foi realizada a partir de um ponto de amostragem no focinho de cada animal, posicionado para minimizar o bloqueio do tubo de amostragem com partículas da dieta. Entre o cabresto e o selim, o tubo de amostragem, construído como descrito por Deighton et al. (2014), estava protegido dentro de uma mangueira flexível (2m×8mm OD, RS Components Pty Ltd., Wetherill Park, NSW, Austrália). O uso de selas em vez de equipamentos montados no pescoço reduz os danos aos aparelhos de amostragem e permite que o animal introduza a cabeça nos cochos automáticos de alimentação. As selas leves foram construídas com malha de selim para evitar a abrasão da pele ou acúmulo de suor. Para corrigir a emissão de metano por dia por animal para as concentrações ambientais de metano, amostras dos gases foram colhidas a partir do ar do ambiente utilizando 2 cilindros/dia, esses cilindros foram colocados no piquete onde estavam os animais. No final de cada período de amostragem, as concentrações SF_6 e CH_4 das amostras foram determinadas por cromatografia gasosa por um cromatógrafo.

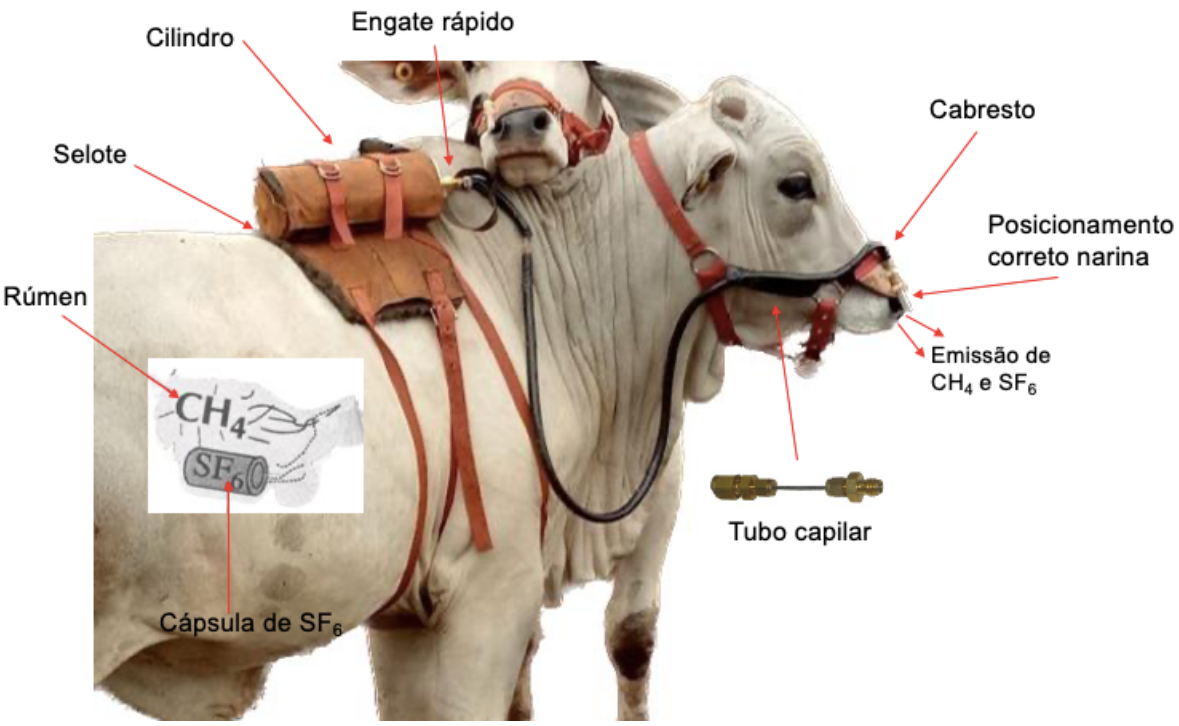

Figura 1. Esquema da coleta do metano através do método do gás traçador SF_6

A emissão de metano entérico de cada animal (ani) foi calculada utilizando as concentrações de metano e de SF_6 das amostras colhidas a cada dia, já ajustadas para as concentrações ambientais (ar), e a taxa conhecida de liberação de SF_6 do tubo de permeação de cada animal, como descrito na seguinte equação:

$$\boldsymbol{RCH4 = RSF6\ \frac{[CH4]ani-[CH4]ar}{[SF6]ani-[SF6]ar}\ x\ \frac{PMCH4}{PMsf6}\ x1000CH4,}$$

em que RCH_4 é a taxa de emissão de metano (g/dia), RSF_6 é a taxa de SF_6 liberada pelo tubo de permeação (mg/dia), $[CH_4]$ani e $[SF_6]$ani são, respectivamente, as concentrações de metano e de SF_6 de cada uma das cinco amostras de cada animal, $[CH_4]$ar e $[SF_6]$ar são, respectivamente, as concentrações de metano e de SF_6 de cada amostra colhida no ambiente. Concentrações de metano são expressas em partes por milhão (µmol/mol) enquanto de SF_6 são expressas em partes por trilhão (pmol/mol) das amostras de gás colhidas. O peso molecular do metano ($PMCH_4$) é 16 e o do SF_6 ($PMSF_6$) é 146, e o multiplicador 1000 considera as diferentes unidades de $[CH_4]$ e $[SF_6]$ e RSF_6, de modo que RCH_4 é expresso como g CH_4/dia. A emissão diária de

metano (g CH_4/dia) de cada animal foi a média aritmética das emissões dos cinco dias de colheita, considerando um coeficiente de variação de até 10% entre as amostras.

A emissão de metano entérico também foi expressa como: CH_4 por kg de consumo de matéria seca (CH_4CMS), CH_4 por kg de peso corporal no meio do teste (CH_4PVM), CH_4 por ganho médio diário (CH_4GMD) e CH_4 residual (CH_4 observado - CH_4 previsto por regressão de CH_4 em CMS, CH_4R).

3.5 Arquivos de genótipos

Foram incluídos nesse estudo informações fenotípicas das características de emissão de metano de 743 animais, além de genótipos oriundos de 6.239 animais. Os genótipos utilizados são referentes a animais participantes dos testes de eficiência alimentar e pertencentes aos programas de seleção do IZ e do Qualitas.

Conjuntos de dados genotipados de 1.376 touros Nelore com o painel de alta densidade de 770k (Illumina Inc., San Diego, CA) foram usados como referência para imputar os demais genótipos dos animais em cinco painéis com diferentes números de SNPs (~74k; ~70k; ~56k; ~54k e ~29k), resultando em um arquivo com 612.155 SNPs (sem os cromossomos sexuais e após controle de qualidade) para todos os 6.239 animais.

Para a imputação foi utilizado o programa FImpute v.2.2 (Sargolzaei et al., 2014), sendo considerado o pedigree dos animais. Foram considerados apenas cromossomos autossômicos e marcadores com posição conhecida para as análises.

O controle de qualidade dos genótipos foi realizado por processo iterativo. Somente os SNPs dos cromossomos autossômicos e com “genecall score” maior que 0,70 foram analisados. SNPs com call rate maior que 0,90 foram considerados na análise e foram removidos SNPs com frequência abaixo de 5% (204.939 removidos). O número total de SNPs utilizados nas análises com os genótipos após o controle de qualidade foi de 407.213.

O arquivo de pedigree foi montado a partir de buscas pelos bancos de dados dos animais em cada grupo. Para as análises esses animais foram renumerados de forma a unir as bases, onde foi gerado o arquivo com 18.352 animais.

3.6 Análises genéticas

3.6.1 Estimativa de herdabilidade e estudo de associação genômica

Os dados foram analisados ajustando modelo animal univariado (*single-step* GBLUP (BLUPF90 packages) com os efeitos fixos de classe de grupo de amostragem e idade na coleta de CH_4 como covariável (linear e quadrática), bem como os efeitos aleatórios genético aditivo direto e de ambiente temporário.

O modelo pode ser representado em notação matricial como:

$$\boldsymbol{y = X\beta + Zu + e,}$$

em que *y* é o vetor das observações; *β* é o vetor dos efeitos fixos; *u* é o vetor do efeito genético aditivo direto; *e* é o vetor de efeitos residuais; e *X* e *Z* são as matrizes de incidência, que relacionam os registros aos efeitos fixos e genéticos, respectivamente.

Neste modelo, o efeito genético aditivo do animal foi modelado utilizando a matriz *H*, a qual combina a informação do arquivo de pedigree (matriz *A*) e a informação molecular (matriz *G*), de maneira que a inversa do numerador da matriz de parentesco (A^{-1}) foi substituída por H^{-1} (Aguilar et al., 2009):

$$\boldsymbol{H^{-1} = A^{-1} + \left[\, 0\ 0\ 0\ G^{-1} - A_{22}^{-1} \right],}$$

onde G^{-1} é a inversa da matriz de parentesco genômica e $\boldsymbol{A_{22}^{-1}}$ é a inversa da matriz de parentesco dos animais genotipados. A matriz G foi calculada da seguinte forma:

$$\boldsymbol{G = (M - P)(M - P)/2 \sum_{j=i}^{m} Pj\,(1 - Pj),}$$

onde M é uma matriz de compartilhamento de alelos com m colunas (m= número total de marcadores) e n linhas (n= número total de animais genotipados), e *P* é uma matriz contendo a frequência do segundo alelo (*pj*), expresso como 2*pj*. M*ij* é 0 se o animal genotipado *i* para o SNP *j* for homozigoto 11, é 1 se heterozigoto, ou 2 se o genótipo for homozigoto 22.

Os efeitos dos SNPs foram obtidos de forma iterativa com auxílio do programa postGSf90, de acordo com o algoritmo proposto por Wang et al. (2014), os quais

descrevem que o efeito de cada marcador (SNP) pode ser obtido em função do valor genético genômico dos animais genotipados da seguinte maneira:

$$\widehat{\boldsymbol{\theta}} = \boldsymbol{DZ}'[\boldsymbol{ZDZ}']^{-\mathbf{1}}\hat{\mathrm{u}},$$

onde, $\hat{\theta}$ é o vetor com o efeito dos SNPs, D é uma matriz diagonal com ponderadores para o efeito dos marcadores; Z é a matriz de genótipos; û é o vetor com os valores genéticos preditos para os animais genotipados.

Três iterações foram rodadas, onde foi considerada apenas a segunda iteração, de maneira que na primeira iteração a matriz D é igual a uma matriz identidade e, nas outras duas iterações, a matriz D é uma matriz diagonal contendo os ponderadores calculados na iteração anterior.

Para o estudo de GWAS, foi realizado o mapeamento das regiões genômicas de maior efeito sobre a expressão de cada característica foi realizado, e com os resultados foram gerados gráficos do tipo Manhattan, contendo a variância explicada por janelas de aproximadamente 1 Mb. A identificação dos genes presentes nas janelas de maior efeito (< 0,05% da variância genética aditiva) foi realizada por meio da ferramenta BioMart no banco de dados Ensembl (genes 109 - https://www.ensembl.org), utilizando como referência a versão de anotação do genoma bovino ARS-UCD1.2.

4. RESULTADOS

As análises descritivas das características de desempenho e emissão de metano mensuradas no estudo estão apresentadas na Tabela 2. Os animais apresentaram peso vivo médio de 353 kg, consumo de matéria seca de 8,52 kg, ganho médio diário de 1,195 kg e emissão de metano de 180,7 g/dia.

Tabela 2. Estatística descritiva das características de desempenho e de metano em animais Nelore

Características[1]	N	Média (± DP)	Mínimo	Máximo
Idade inicial (dias)	751	357 ± 144	179	763
Idade coleta (dias)	751	402 ± 146	198	816
Peso Inicial (kg)	751	308 ± 114	134	670
Peso vivo médio (kg)	751	353 ± 120	159	726
Ganho médio diário (kg)	751	1,195 ± 0,491	0,198	3,342
Consumo de matéria seca (kg)	751	8,52 ± 1,71	4,51	13,9
Consumo alimentar residual	751	0,00 ± 0,7199	-3,709	3,175
Emissão de metano (g/dia)	743	180,7 ± 60,9	70,5	444,4
Metano por CMS (g/kg/dia)	743	21,2 ± 5,28	10,8	42,5
Metano por GMD (g/kg/dia)	743	162,8 ± 60,2	62,1	1049
Metano por PVM (g/kg)	743	0,529 ± 0,134	0,258	1,04
Metano residual (g/dia)	743	0,00 ± 27,3	-130,48	161,8

[1]CMS: Consumo de matéria seca, GMD: Ganho médio diário, PVM: Peso vivo médio.

4.1 Estimativa de herdabilidade

As estimativas de herdabilidade das características de metano estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativas de herdabilidade das características de metano em animais Nelore.

Características[1]	Herdabilidade	Erro
CH_4gd	0,39474	0,08858
CH_4CMS	0,20353	0,08286
CH_4GMD	0,03619	0,03844
CH_4PVM	0,06025	0,05924
CH_4R	0,20317	0,08579

[1]CH_4gd: emissão de CH_4 em g/d, CH_4CMS: emissão de metano por kg de consumo de matéria seca, CH_4GMD: emissão de metano por ganho médio diário, CH_4PVM: emissão de metano por kg de peso vivo médio, CH_4R: emissão de metano residual.

4.2 Estudo de associação genômica

4.2.1 Emissão de metano

Para a característica emissão de metano (CH_4gd) foram identificadas sete janelas distribuídas nos cromossomos 5, 11, 13, 17 e 20 que explicam cada uma mais de 0,5% da variância genética aditiva (Figura 2) para a característica. Tais janelas juntas explicam 5,43% da variância genética aditiva para emissão de metano (Tabela 4). O cromossomo 20 se destacou por apresentar duas (2) janelas, que juntas explicam 2,21% da emissão de metano. A região 39732673 - 40729198 bp no cromossomo 20 foi identificada como responsável pela maior percentagem da variância genética aditiva da característica CH_4gd.

Tabela 4. Regiões genômicas que explicam mais que 5% da variância genética aditiva de emissão de metano em Nelore.

Cromossomo	Posição	Genes	% variância explicada pela janela de SNPs
20	39732673 - 40729198	C1QTNF3, AMACR, SLC45A2, RXFP3, ADAMTS12, TARS1	1,54197
13	17780066 - 18779619	ACBD5, ABI1, PDSS1, APBB1IP, CCNY, CREM, CUL2, PARD3	0,84926
11	97234377 - 98232307	MVB12B, LMX1B, ZBTB43, ZBTB34, RALGPS1, ANGPTL2, GARNL3, SLC2A8, ZNF79, RPL12, SNORA65, LRSAM1, NIBAN2	0,69540
20	35391014 - 36390016	RICTOR, OSMR, LIFR, EGFLAM	0,66625
17	57281378 - 58279182	KSR2, NOS1, FBXO21, TESC, FBXW8, RNFT2, SPRING1	0,57121
11	53932016 - 54930465	CTNNA2	0,56595
5	46246211 - 47245926	CAND1, GRIP1	0,54884

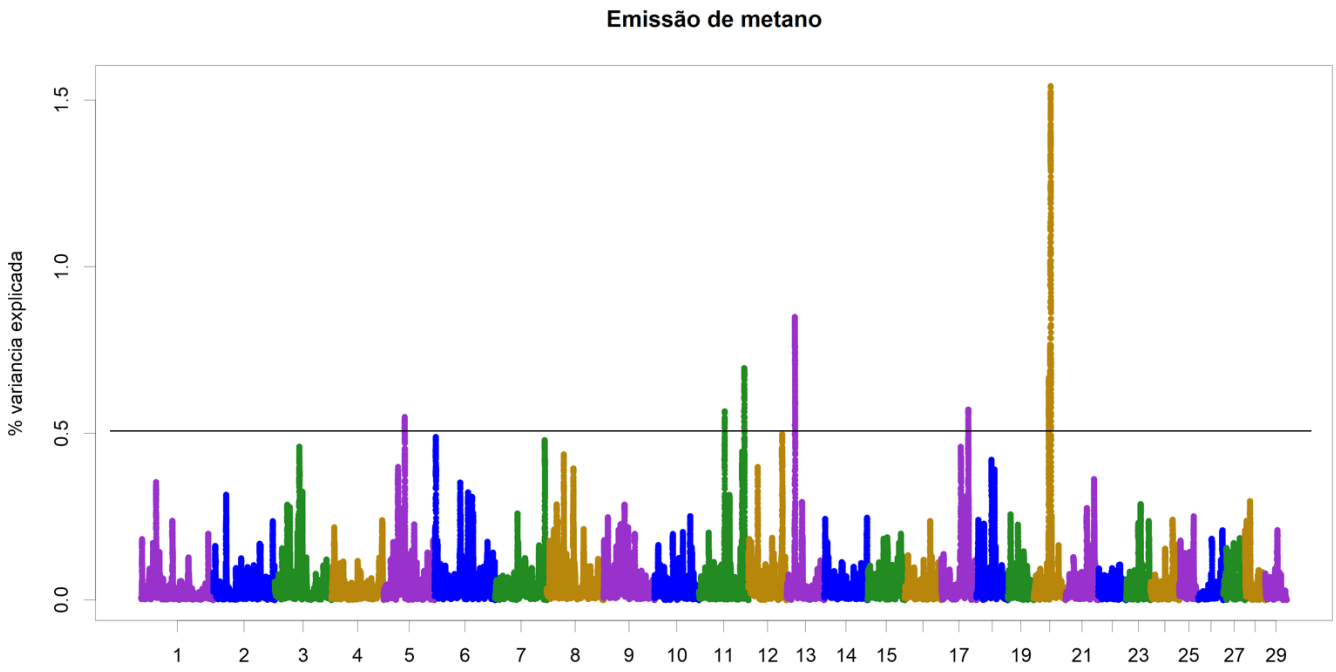

Figura 2. Manhattan Plot da variância genética aditiva explicada por janelas de 1 Mb de SNPs adjacentes para a característica emissão de metano em gado Nelore

4.2.2 Emissão de metano por consumo de matéria seca

Para CH_4CMS foram identificadas nove janelas distribuídas nos cromossomos 5, 6, 11, 13, 14, 16, 17 e 20 que explicam cada uma mais de 0,5% da variância genética aditiva (Figura 3) para a característica. Tais janelas juntas explicam 7,67% da variância genética aditiva para emissão de metano por consumo de matéria seca (Tabela 5). O cromossomo 5 se destacou por apresentar duas janelas, que juntas explicam 1,90% da emissão de metano. A região 39697429 - 40695738 bp no cromossomo 20 foi identificada como responsável pela maior percentagem da variância genética aditiva da característica CH_4CMS.

Tabela 5. Regiões genômicas que explicam mais que 5% da variância genética aditiva de emissão de metano por consumo de matéria seca em Nelore

Cromossomo	Posição	Genes	% variância explicada pela janela de SNPs
20	39697429 - 40695738	C1QTNF3, U6, AMACR, SLC45A2, RXFP3, ADAMTS12, TARS1	1,36016
5	46374885 - 47374307	CAND1, GRIP1	1,27459
11	97234377 - 98232307	MVB12B, LMX1B, ZBTB43, ZBTB34, RALGPS1, ANGPTL2, GARNL3, SLC2A8, ZNF79, RPL12, SNORA65, LRSAM1, NIBAN2	0,90217
6	65648826 - 66628693	GABRB1, COMMD8, ATP10D, CORIN, NFXL1	0,80321
16	63018037 - 64015974	ZNF648, GLUL, TEDDM1, RGSL1, RNASEL, RGS16, RGS8, NPL, DHX9, SHCBP1L	0,80167
13	17782946 - 18781618	ACBD5, ABI1, PDSS1, APBB1IP, CCNY, CREM, CUL2, PARD3	0,78675
5	31159008 - 32149474	LALBA, OR8S8, OR8S27, OR8S25, OR8S10, OR8S15, OR8S1, OR8S24, C5H12orf54, OR8S2, OR8S26, OR8S3, OR5BJ2, ZNF641, H1-7, OR10AD1, CCDC184, ASB8, PFKM	0,63100
14	81160929 - 82159089	TAF2, DSCC1, DEPTOR, COL14A1, U6, MRPL13, MTBP, SNTB1	0,58074
17	57284699 - 58282310	KSR2, NOS1, FBXO21, TESC, FBXW8, RNFT2, SPRING1	0,53957

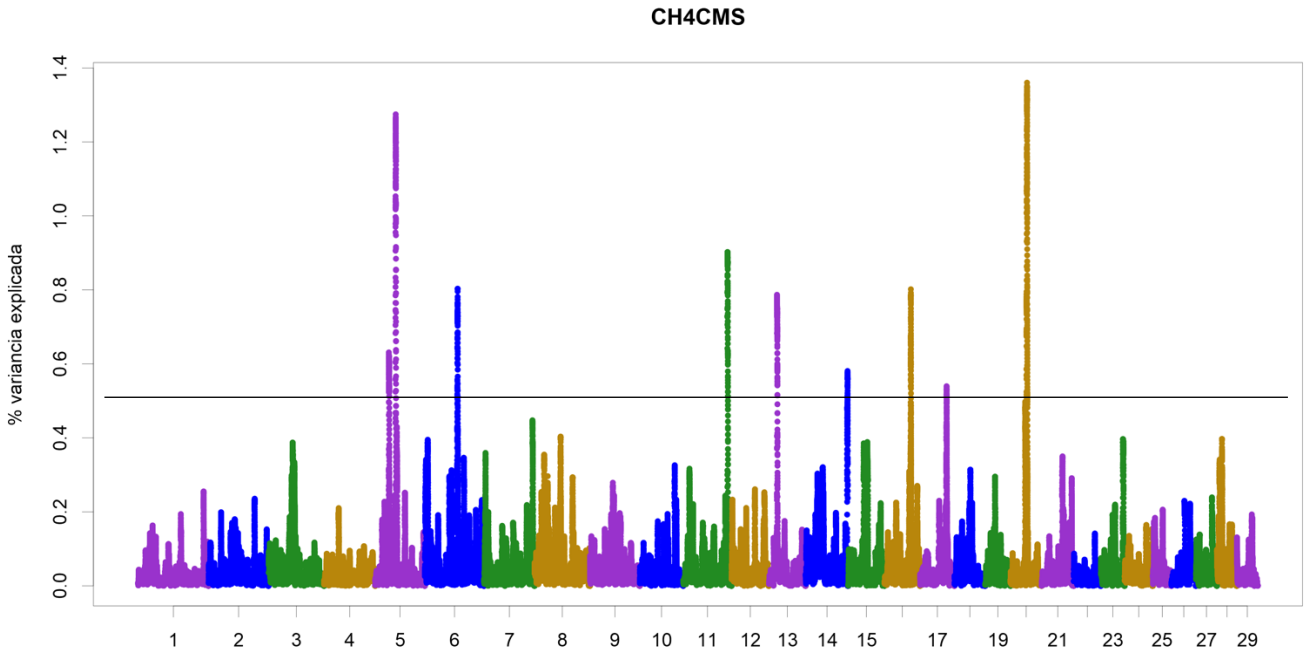

Figura 3. Manhattan Plot da variância genética aditiva explicada por janelas de 1 Mb de SNPs adjacentes para a característica emissão de metano por consumo de matéria seca em gado Nelore

4.2.3 Emissão de metano por ganho médio diário

Foram identificadas sete janelas distribuídas nos cromossomos 5, 11, 14, 16 e 17 que explicam mais de 0,5% da variância genética aditiva para CH_4GMD possui oito janelas (Figura 4). Tais janelas juntas explicam 4,52% da variância genética aditiva para emissão de metano por ganho médio diário (Tabela 6). A região 68220665 - 69211669 bp no cromossomo 5 foi identificada como responsável pela maior percentagem da variância genética aditiva da característica CH_4GMD.

Tabela 6. Regiões genômicas que explicam mais que 5% da variância genética aditiva de emissão de metano por ganho médio diário em Nelore

Cromossomo	Posição	Genes	% variância explicada pela janela de SNPs
5	68220665 - 69211669	CHST11, SLC41A2, NOPCHAP1, ALDH1L2, WASHC4, APPL2	0,73860
17	57284699 - 58282310	KSR2, NOS1, FBXO21, TESC, FBXW8, RNFT2, SPRING1	0,68607
11	97689477 - 98688524	RALGPS1, ANGPTL2, GARNL3, SLC2A8, ZNF79, RPL12, LRSAM1, NIBAN2, STXBP1, CFAP157, PTRH1, TTC16, TOR2A, SH2D3C, CDK9, FPGS, ENG, AK1, ST6GALNAC6, ST6GALNAC4, PIP5KL1, DPM2, FAM102A	0,68339
17	55828804 - 56827694	TMEM233, CCDC60 HSPB8, SRRM4	0,66529
14	30362709 - 31362286	DNAJC5B, TRIM55, CRH, RRS1, ADHFE1, VXN, U6, MYBL1, VCPIP1, SGK3, MCMDC2, SNORD87, TCF24, PPP1R42, COPS5, CSPP1, ARFGEF1	0,61752
16	35526958 - 36525642	RGS7, XCL1, DPT	0,58342
14	24399063 - 25395406	FAM110B, UBXN2B, CYP7A1, SDCBP, NSMAF, TOX	0,55131

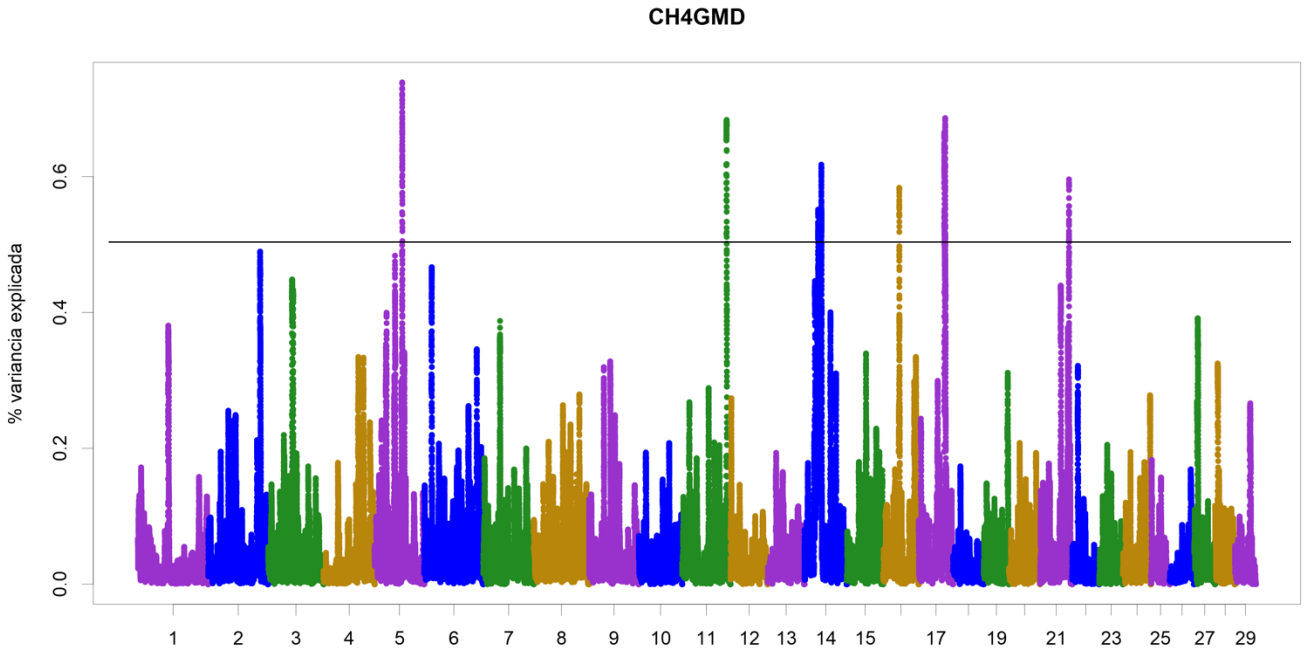

Figura 4. Manhattan Plot da variância genética aditiva explicada por janelas de 1 Mb de SNPs adjacentes para a característica emissão de metano por ganho médio diário em gado Nelore

4.2.4 Emissão de metano para peso vivo médio

Foram identificadas oito janelas nos cromossomos 5, 6, 11, 13, 17 e 20 que explicam mais de 0,5% da variância genética aditiva (Figura 5) para CH_4PVM. Tais janelas juntas explicam 6,69% da variância genética aditiva para emissão de metano por peso vivo médio (Tabela 7). O cromossomo 11 se destacou por apresentar duas janelas, que juntas explicam 1,44% da emissão de metano. A região 39697429 - 40695738 bp no cromossomo 20 foi identificada como responsável pela maior percentagem da variância genética aditiva da característica CH_4PVM.

Tabela 7. Regiões genômicas que explicam mais que 5% da variância genética aditiva de emissão de metano por peso vivo médio em Nelore

Cromossomo	Posição	Genes	% variância explicada pela janela de SNPs
20	39697429 - 40695738	C1QTNF3, AMACR, SLC45A2, RXFP3, ADAMTS12, TARS1	1,71534
5	46374885 - 47374307	CAND1, GRIP1	1,23461
11	97689477 - 98688524	RALGPS1, ANGPTL2, GARNL3, SLC2A8, ZNF79, RPL12, SNORA65, LRSAM1, NIBAN2, STXBP1, CFAP157, PTRH1, TTC16, TOR2A, SH2D3C, CDK9, FPGS, ENG, AK1, ST6GALNAC6, ST6GALNAC4, PIP5KL1, DPM2, FAM102A	0,92327
17	57277160 - 58275550	KSR2, NOS1, FBXO21, TESC, FBXW8, RNFT2, SPRING1	0,71671
6	65634064 - 66628693	GABRB1, COMMD8, ATP10D, CORIN, NFXL1	0,57040
5	31159008 - 32149474	LALBA, OR8S8, OR8S27, OR8S25, OR8S10, OR8S15, OR8S1, OR8S24, C5H12orf54, OR8S2, OR8S26, OR8S3, OR5BJ2, ZNF641, H1-7, CCDC184, ASB8, PFKM	0,51768
11	10894581 - 11893310	ALMS1, EGR4, FBXO41, CCT7, PRADC1, SMYD5, NOTO, 7SK, RAB11FIP5, SFXN5, EMX1, SPR, EXOC6B	0,51281
13	17780066 - 18779619	ACBD5, ABI1, PDSS1, APBB1IP, CCNY, CREM, CUL2, PARD3	0,50620

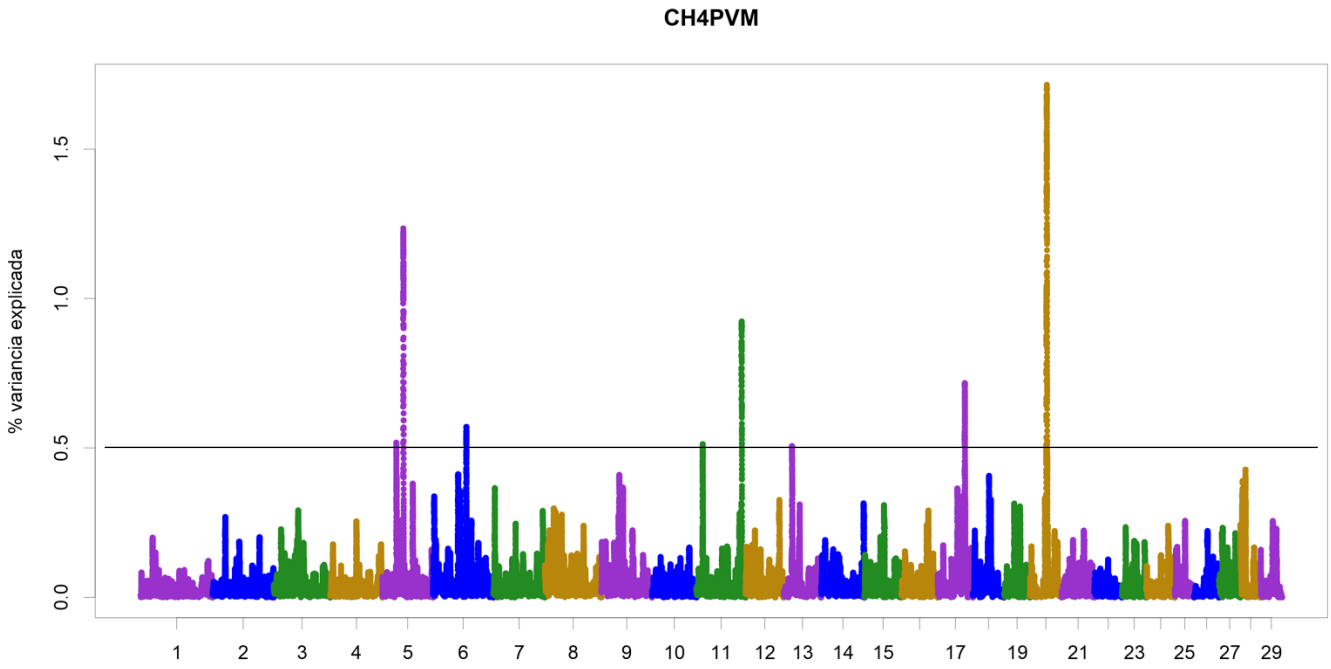

Figura 5. Manhattan Plot da variância genética aditiva explicada por janelas de 1 Mb de SNPs adjacentes para a característica emissão de metano por peso vivo médio em gado Nelore

4.2.5 Emissão de metano residual

Para a característica CH_4R foram identificadas oito janelas distribuídas nos cromossomos 5, 6, 11, 13, 16 e 20 que explicam mais de 0,5% da variância genética aditiva (Figura 6) para a característica. Tais janelas juntas explicam 6,75% da variância genética aditiva para emissão de metano (Tabela 8). O cromossomo 5 se destacou por apresentar duas janelas, que juntas explicam 1,61% da emissão de metano. A região 39697429 - 40695738 bp no cromossomo 20 foi identificada como responsável pela maior percentagem da variância genética aditiva da característica CH_4R.

Tabela 8. Regiões genômicas que explicam mais que 5% da variância genética aditiva de emissão de metano residual em Nelore

Cromossomo	Posição	Genes	% variância explicada pela janela de SNPs
20	39697429 - 40695738	C1QTNF3, U6, AMACR, SLC45A2, RXFP3, ADAMTS12, TARS1	1,56873
5	46374885 - 47374307	CAND1, GRIP1	0,96239
13	17782946 - 18781618	ACBD5, ABI1, PDSS1, APBB1IP, CCNY, CREM, CUL2, PARD3	0,84780
11	97234377 - 98232307	MVB12B, LMX1B, ZBTB43, ZBTB34, RALGPS1, ANGPTL2, GARNL3, SLC2A8, ZNF79, RPL12, LRSAM1, NIBAN2	0,79587
6	65663899 - 66662347	GABRB1, COMMD8, ATP10D, CORIN, NFXL1	0,69403
16	63018037 - 64015974	ZNF648, GLUL, TEDDM1, RGSL1, RNASEL, RGS16, RGS8, NPL, DHX9, SHCBP1L	0,67036
5	31718185 - 32714389	OR8S3, OR5BJ2, ZNF641, H1-7, CCDC184, ASB8, PFKM, SENP1, COL2A1, TMEM106C, VDR, HDAC7, SLC48A1, RAPGEF3, ENDOU, RPAP3	0,64582
20	35391014 - 36390016	RICTOR, OSMR, LIFR, EGFLAM	0,57205

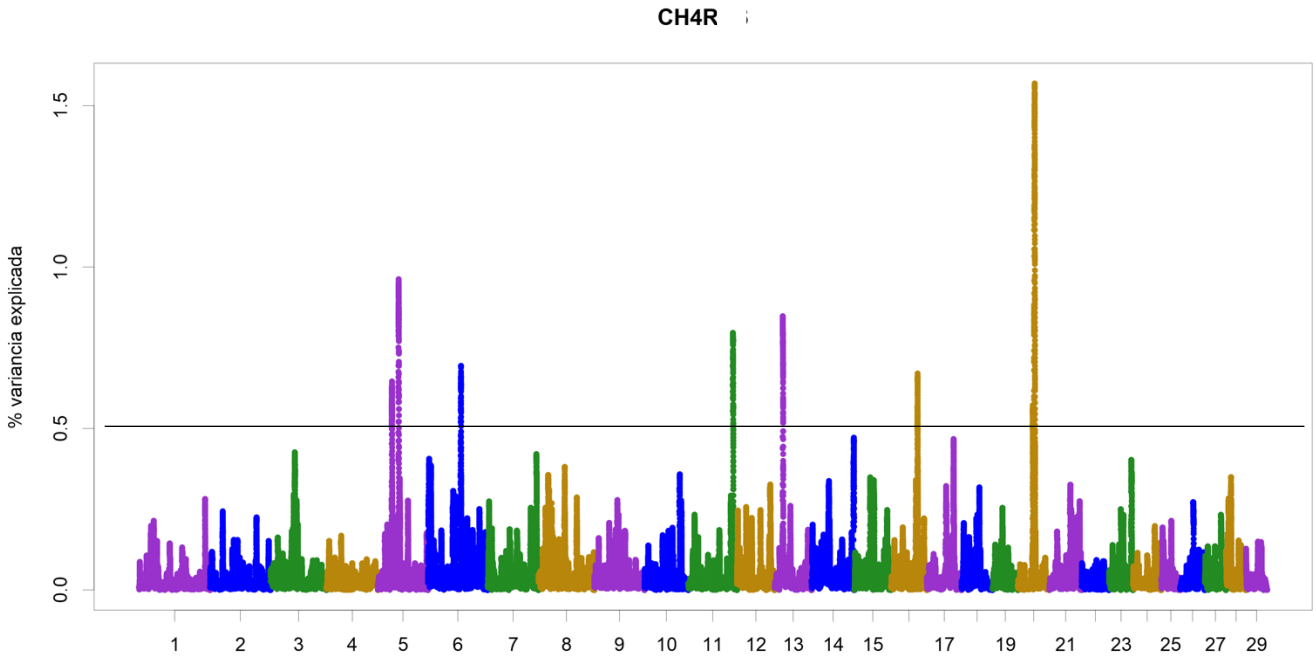

Figura 6. Manhattan Plot da variância genética aditiva explicada por janelas de 1 Mb de SNPs adjacentes para a característica emissão de metano residual em gado Nelore

5. DISCUSSÃO

As características CH_4GMD e CH_4PVM apresentaram as estimativas de herdabilidade mais baixas (0,036 e 0,060, respectivamente). O CH_4gd, CH_4CMS e o CH_4R apresentaram estimativas de herdabilidade moderada (Tabela 2).

No estudo de Donogue et al. (2016) bovinos de corte da raça Angus, a coleta de metano foi realizada pelo método de câmaras respirométricas, a estimativa de herdabilidade obtida para a produção de metano foi de 0,27 ± 0,07, considerada de baixa a média magnitude e menor quando comparada ao presente estudo.

Uemoto et al. (2020), realizaram estudo com bovinos de corte Aberdeen Angus, a emissão de metano foi predita por meio da percentagem de energia da ração convertida em metano e consumo de energia bruta. Foram descritas estimativas de

herdabilidade de alta magnitude, para CH_4 e CH_4CMS, valores de 0,57 ± 0,05 e 0,59 ± 0,05, respectivamente.

No estudo de Richardson et al. (2021), que realizaram avaliação de vacas de leite e coleta de metano pelo método do gás traçador SF_6, as estimativas de herdabilidade apresentadas foram de baixa a média magnitude (CH_4 corrigido para CMS e CH_4 corrigido para energia do leite, sendo respectivamente, 0,18 ± 0,11 e 0,21 ± 0,11).

As características relativas ao metano, como CH_4CMS e CH_4R, possuem uma quantidade de CH_4 relacionada ao consumo, então são características importantes, porque se diminuir o CH_4CMS e CH_4R, irá aumentará a produtividade do rebanho (Knapp et al., 2014).

As características CH_4GMD e CH_4PVM são estimadas dependendo de outras características (ganho médio diário e peso vivo no meio do teste, respectivamente), isso pode ser o motivo das estimativas de herdabilidade terem sido baixas.

De acordo com os resultados desse estudo, foram obtidas estimativas de herdabilidade de baixa a média magnitude de características relacionadas ao metano, demonstrando o potencial de utilização das características como critérios de seleção em bovinos de corte, usando conjunto de dados como coletas consecutivas em cinco dias e por meio do método do gás traçador SF_6.

Os resultados das estimativas de herdabilidade das características, embora apresentem diferenças dos resultados da literatura, sugere quando aplicado como critério de seleção de reprodutores, ganho genético, dado que a maior parte da variação genética da emissão de metano se deve a variação genética do consumo de matéria seca e peso corporal. De acordo com Knapp et al. (2014), a variação do consumo de matéria seca é responsável por 52% a 64% da variação da emissão de metano. As características relacionadas ao metano também dependem das características de peso de mantença (de Haas et al., 2017).

O cromossomo 20 se destacou por apresentar uma janela que explicam 1,54% da característica CH_4gd, 1,36% da característica CH_4CMS, 1,56% da característica CH_4R. O cromossomo 5 e o cromossomo 17 se destacaram por apresentar duas janelas, que juntas explicam 1,39% da característica CH_4GMD. Para a característica

CH_4PVM os cromossomos 20 e se destacaram por apresentar duas janelas que explicam 2,94% da característica.

A janela 39697429 - 40695738 do cromossomo 20 teve uma grande participação na explicação da variância aditiva na maioria das características de emissão de metano (CH_4gd, CH_4CMS, CH_4PVM e CH_4R), mas foi possível perceber uma boa participação das janelas nos cromossomos 5 na janela 46246211 - 47245926 e 17 na janela 57281378 - 58279182.

Vários genes foram identificados, como o gene C1QTNF3 está envolvido na deposição de gordura subcutânea e intramuscular, onde desempenha papel importante na fisiologia dos adipócitos, como lipólise e secreção de adipocinas (Sheng et al., 2014).

O gene ACBD5 atua no transporte e distribuição de acil-coenzima A de cadeia longa nas células, atuando no metabolismo de lipídeo (Cheng et al., 2015). O gene ADAMTS12 foi relatado em vários estudos de associação do genoma de características como peso da carcaça, onde está envolvido na regeneração do músculo esquelético (Edea et al., 2018). O gene ANGPTL2 está envolvido na angiogênese e no metabolismo de glicose e lipídeos, o que sugere papel importante no desenvolvimento e crescimento de indivíduos (Cabia et al., 2016 e Duan et al., 2021).

A importância do peso corporal para explicar as emissões de metano da fermentação entérica pode ser atribuída à relação entre o peso corporal e a capacidade do intestino, porque o volume do intestino é proporcional ao peso corporal (Demment e Van Soest, 1985). Segundo Di Marco et al. (2007), o histórico alimentar e o aumento do ganho de peso vivo são características que determinam a quantidade de gordura subcutânea depositada, podendo influenciar nas emissões de metano.

Animais com diferentes pesos corporais, ao consumirem quantidades semelhantes de uma mesma dieta, apresentariam diferentes taxas de passagem ruminal e quantidades de alimentos fermentados. Essa diferença alteraria a produção de ácidos graxos voláteis e, consequentemente, as emissões de metano, dado que a quantidade de metano produzida por um animal ruminante está relacionada com a quantidade de matéria orgânica digerida no rúmen, principalmente a fração fibrosa e,

portanto, a quantidade de acetato e hidrogênio metabólico produzida (Moraes et al., 2014 e Garnsworthy et al., 2019).

De acordo com Abo-Ismail et al. (2018), o gene OSMR está relacionado diretamente com a eficiência alimentar. A característica de emissão de metano está relacionada diretamente com o consumo de alimentos, ou seja, pode ocorrer mudança no padrão de fermentação ruminal devido ao tipo da dieta ou pelo acréscimo de alguma suplementação, que pode afetar o crescimento dos animais e sua eficiência alimentar (Preston e Leng, 1987, Hayes et al., 2013). Dado que os principais determinantes da produção diária de metano, são o consumo de matéria seca e a composição da dieta, quanto mais ração consumida ou maior o teor de fibra da dieta, mais metano é produzido por dia (Knapp et al., 2014). De forma que os animais tenham o mesmo peso corporal, mesmo ganho de peso e o mesmo teor de gordura corporal, animais mais eficientes tendem a emitir menos metano por dia, por apresentar menor consumo de matéria seca (Dini et al., 2019).

O gene NOS1 está associado a manutenção da homeostase redox celular, devido à sua capacidade de neutralizar ROS nocivos produzidos durante o estresse térmico, as atividades de enzimas antioxidantes, níveis de osmólitos e a expressão de genes responsivos ao estresse (Sigdel et al., 2020). O gene ERCC5 mostrou efeitos significativos para características de carcaça e qualidade da carne, aumentando o rendimento de carne magra e diminuindo a gordura (Abo-Ismail et al., 2014).

Bovinos menos reativos geralmente ingerem maiores quantidades de ração e está associado a maior crescimento e deposição de gordura quando comparados a animais mais reativos, essa ingestão tem efeito nas emissões de metano dos animais (Llonch et al., 2016 e 2018). O temperamento e a resposta ao estresse devem ser considerados ao projetar estratégias para melhorar a eficiência e mitigar as emissões de CH_4 em bovinos de corte (Llonch et al., 2016).

O gene COL14A1 foi altamente expresso no grupo de baixo marmoreio (Chen et al., 2019) e foi encontrado apenas na característica CH_4GMD. Os genes estão associados com deposição de gordura, peso de carcaça, crescimento e desenvolvimento, eficiência alimentar, estresse térmico, qualidade da carne, marmoreio.

Quando se compara os genes presentes em todas as características, percebe-se que vários genes são observados na maioria das características de emissão de metano analisadas, dado que as características analisadas são variações da característica principal emissão de metano. Com os resultados obtidos, as características CH_4gd, CH_4CMS e CH_4R poderão ser utilizadas por um programa de melhoramento, por terem apresentado herdabilidades moderadas e alguns genes associados a emissão de metano.

6. CONCLUSÃO

O valor da estimativa de herdabilidade para a característica emissão de metano demonstra o potencial de seu uso como critério de seleção em programas de melhoramento genético animal. Em conclusão, as características relativas a emissão de metano podem ser incluídas em programas de melhoramento animal.

REFERÊNCIAS

Abo-Ismail MK, Vander Voort G, Squires JJ, Swanson KC, Mandell IB, Liao X, Miller SP (2014) Single nucleotide polymorphisms for feed efficiency and performance in crossbred beef cattle. **BMC Genetics** 15:1-14.

Cabia B, Andrade S, Carreira MC, Casanueva FF, Crujeiras AB (2016) A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. **Obesity Reviews** 17:361-376.

Carvalheiro R, Boison SA, Neves HH, Sargolzaei M, Schenkel FS, Utsunomiya Y T, Garcia JF (2014) Accuracy of genotype imputation in Nellore cattle. **Genetics Selection Evolution**, 46:1-11.

Chen D, Li W, Du M, Cao B (2019) Adipogenesis, fibrogenesis and myogenesis related gene expression in longissimus muscle of high and low marbling beef cattle. **Livestock Science** 229:188-193.

Cheng Z, Oguejiofor CF, Swangchan-Uthai T, Carr S, Wathes DC (2015) Relationships between circulating urea concentrations and endometrial function in postpartum dairy cows. **Animals** 5:748-773.

de Haas Y, Pszczola M, Soyeurt H, Wall E, Lassen J (2017) Invited review: Phenotypes to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. **Journal of Dairy Science** 100:855-870.

Deighton MH, O'loughlin BM, Buckley F, Boland TM (2011) A simple method for pre-calibration storage of sulphur hexafluoride permeation tubes. **Animal Feed Science and Technology** 166:198-200.

Deighton MH, O'loughlin BM, Williams SRO, Moate PJ, Kennedy E, Boland TM, Eckard RJ (2013) Declining sulphur hexafluoride permeability of polytetrafluoroethylene membranes causes overestimation of calculated ruminant methane emissions using the tracer technique. **Animal Feed Science and Technolology** 183:86-95.

Deighton MH, Williams SRO, Hannah MC, Eckard RJ, Boland TM, Wales WJ, Moate PJ (2014) A modified sulphur hexafluoride tracer technique enables accurate determination of enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology** 197:47-63.

Demment MW, Van Soest PJ (1985) A nutritional explanation for body-size patterns of ruminant and nonruminant herbivores. **The American Naturalist** 125:641-672.

Dini Y, Cajarville C, Gere JI, Fernandez S, Fraga M, Pravia MI (2019) Association between residual feed intake and enteric methane emissions in Hereford steers. **Translational Animal Science** 3:239-46.

Di Marco ON, Barcellos JOJ, da Costa EC (2007) Crescimento de bovinos de corte. Porto Alegre: Ufrgs. p. 276.

Donoghue KA, Bird-Gardiner T, Arthur PF, Herd RM, Hegarty RF (2016) Genetic and phenotypic variance and covariance components for methane emission and postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, 94:1438-1445.

Edea Z, Jeoung YH, Shin SS, Ku J, Seo S, Kim IH, Kim KS (2018) Genome-wide association study of carcass weight in commercial Hanwoo cattle**. Asian-Australasian Journal of Animal Science** 31:327.

FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2020.

Garnsworthy PC, Difford GF, Bell MJ, Bayat AR, Huhtanen P, Kuhla B, Yan T (2019) Comparison of methods to measure methane for use in genetic evaluation of dairy cattle. **Animals** 9:837.

Grion AL, Mercadante MEZ, Cyrillo JNSG, Bonilha SFM, Magnani E, Branco RH (2014) Selection for feed efficiency traits and correlated genetic responses in feed intake and weight gain of Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, 92:955-965.

Hammond KJ, Waghorn GC, Hegarty RS (2016) The GreenFeed system for measurement of enteric methane emission from cattle. **Animal Production Science** 56:181-189.

Hayes BJ, Donoghue KA, Reich CM, Mason BA, Bird-Gardiner T, Herd RM, Arthur PF (2016) Genomic heritabilities and genomic estimated breeding values for methane traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, 94:902-908.

Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM (2014) Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, 97:3231-3261.

Llonch P, Somarriba M, Duthie CA, Haskell MJ, Rooke JA, Troy S, Turner SP (2016) Association of temperament and acute stress responsiveness with productivity, feed efficiency, and methane emissions in beef cattle: an observational study. **Frontiers in Veterinary Science** 3:43.

Llonch P, Somarriba M, Duthie CA, Troy S, Roehe R, Rooke J, Turner SP (2018) Temperament and dominance relate to feeding behaviour and activity in beef cattle: implications for performance and methane emissions. **Animal** 12:2639-2648.

Mercadante MEZ, Packer IU, Razook AG, Cyrillo JNSG, Figueiredo LA (2003) Direct and correlated responses to selection for yearling weight onreproductive performance of Nellore cows. **Journal of Animal Science** 81:376-384.

Moraes LE, Strathe AB, Fadel JG, Casper DP, Kebreab E (2014) Prediction of enteric methane emissions from cattle. **Global Change Biology** 20:2140-2148.

NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 2000.

Preston TR e Leng RA (1987) Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics. Penambul Books. **Livestock Production Science**, 19:532-53.

Richardson CM, Nguyen TTT, Abdelsayed M, Moate PJ, Williams SRO, Chud TCS, Pryce JE (2021) Genetic parameters for methane emission traits in Australian dairy cows. **Journal of Dairy Science** 104:539-549.

Sakamoto LS, Souza LL, Gianvecchio SB, de Oliveira MHV, Silva JAIDV, Canesin RC, Mercadante MEZ (2021) Phenotypic association among performance, feed efficiency and methane emission traits in Nellore cattle. **Plos one** 16:e0257964.

Sargolzaei M, Chesnais JP, Schenkel FS (2014) A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics** 15:1-12.

Sheng X, Ni H, Liu Y, Li J, Zhang L, Guo Y (2014) RNA-seq analysis of bovine intramuscular, subcutaneous and perirenal adipose tissues. **Molecular Biology Reports**, 41:1631-1637.

Sigdel A, Liu L, Abdollahi-Arpanahi R, Aguilar I, Peñagaricano F (2020) Genetic dissection of reproductive performance of dairy cows under heat stress. **Animal Genetics** 51:511-520.

Smith PE, Waters SM, Kenny DA, Kirwan SF, Conroy S, Kelly AK (2021) Effect of divergence in residual methane emissions on feed intake and efficiency, growth and carcass performance, and indices of rumen fermentation and methane emissions in finishing beef cattle. **Journal of Animal Science** 99:275.

Uemoto Y, Takeda M, Ogino A, Kurogi K, Ogawa S, Satoh M, Terada F (2020) Genetic and genomic analyses for predicted methane-related traits in Japanese Black steers. **Animal Science Journal** 91:e13383.

Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Fernando RL, Vitezica Z, Okimoto R, Wing T, Hawken R, Muir WM (2014) Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. **Frontiers in Genetics** 5:134.