

DÉBORA MARTINS PAIXÃO

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

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P149e
2010

Paixão, Débora Martins, 1980-

Estudos de locos de características quantitativas, de expressão
gênica e teste de paternidade em suínos / Débora Martins
Paixão. – Viçosa, MG, 2010.

viii, 86f. : il. ; 29cm.

Orientador: Simone Eliza Facione Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Suíno - Genética. 2. Piau (Suíno). 3. Locos de caracteres
quantitativos. 4. Regulação da expressão gênica. 5. Paternidade.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.40821

DÉBORA MARTINS PAIXÃO

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

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de setembro de 2010.

Prof. Paulo Sávio Lopes
(Co-Orientador)

Pesq. Samuel Rezende Paiva
(Co-Orientador)

Prof. Fabyano Fonseca e Silva

Prof. Sérgio H. Bronmonschenkel

Prof^a. Simone E.F. Guimarães
(Orientadora)

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

T.S.Elliot

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais pelo carinho e apoio incondicional.

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

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

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

Aos membros da banca de defesa.

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

Aos meus colegas do LABTEC pela amizade e paciência.

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

BIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Mapeamento de QTL nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X em suínos: características de carcaça e qualidade de carne	5
RESUMO	5
ABSTRACT -	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	12
Conclusões	25
Agradecimentos	25
Literatura Citada	25
Detecção de Locos de Características Quantitativas nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X de Suínos: características de desempenho.....	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
Introdução	33
Material e Métodos	34
Resultados e Discussão	38
Agradecimentos	45
Literatura Citada	46
Avaliação da expressão de genes selecionados <i>in silico</i> em regiões sob QTL associados a características de interesse econômico em suínos.....	49
RESUMO	49
ABSTRACT	50
Introdução	51
Material e Métodos	52
Animais, coleta e extração do mRNA	52
Análise <i>in silico</i>	53
Teste de eficiência e RT-qPCR.....	56
Análise Estatística.....	57
Resultados	58
Discussão	63
Conclusão	67

Avaliação de marcadores microssatélites para testes de paternidade e rastreabilidade em suínos	70
RESUMO	70
ABSTRACT	71
Introdução	72
Material e Métodos	73
Resultados e Discussão	75
Literatura Citada	80
 CONCLUSÃO GERAL.....	 82
LITERATURA CITADA	83

RESUMO

PAIXÃO, Débora Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010.
Estudos de locos de características quantitativas, de expressão gênica e teste de paternidade em suínos. Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-orientadores: Paulo Sávio Lopes e Samuel Rezende Paiva.

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

ABSTRACT

PAIXÃO, Débora Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010.
Studies of quantitative trait loci, genic expression and of paternity testing in pigs.
Adiser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-Advisers: Paulo Sávio Lopes and Samuel Rezende Paiva.

The accomplishment of the present study had as objective: 1) to map Quantitative Trait Loci (QTL) on chromosomes 1, 2, 3, 12, 14, 15 and X in a F2 pig population developed by mating two Brazilian Piau breed sires with 18 dams from a commercial line (Landrace × Large White × Pietrain); 2) investigate the level of expression of candidate genes influencing economic traits in pigs and 3) develop a panel of microsatellite markers for paternity testing and origin of pigs. A total of 18 QTL were identified to carcass and quality traits and a total of 6 QTL to performance traits, from these, the QTL for cooking loss and for slaughter age (days) was significant at the 5% genome-wise level. The backfat thickness trait was mainly associated with the Piau breed allele, known as a fat pig. It was observed in differences in the expressions of the genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, IGF2 and MyoD1 among groups genetic Piau, commercial and crossbred, opening prospects for further studies, sequencing and search for causal mutation associated with quantitative traits. Accurate information of paternity are fundamental to the estimation of breeding values and thus ensure the success of breeding programs. The 28 microsatellite markers evaluated were highly informative, showed combined exclusion probabilities for the situations where the mother's genotype is known (P_1) and the situation where the mother's genotype is not available (P_2) greater than 99% and can be considered efficient for paternity and traceability analysis in pigs. The results obtained in this study and shown in the various chapters were relevant and contributed to more information about the genomic involved in the development of quantitative traits of economic importance in pigs production and also showed the effectiveness of testing for individual identification in pigs.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior exportador mundial de carne suína, e, devido aos programas de genética e nutrição, o suíno moderno apresenta de 55 a 60% de carne magra na carcaça e apenas 1,5 a 1,0 centímetros de espessura de toucinho de acordo com os dados da Abipecs (2010). O sucesso da seleção para carne magra está baseado na alta herdabilidade da espessura de toucinho (0,40 a 0,70) e na alta correlação genética negativa existente entre a espessura de toucinho e o conteúdo em carne magra na carcaça (-0,30 a -0,40).

Contudo, apesar da correlação entre gordura subcutânea (espessura de toucinho) e intramuscular ser baixa, em torno de 0,20 (Peloso, 2006), a médio e longo prazo, essa redução poderá ter efeitos danosos na qualidade da carne para consumo “*in natura*”, reduzindo a sua suculência e sabor; assim, outro objetivo do melhoramento de suínos, além da produção de carne magra, é melhorar a qualidade desta. Que é uma característica complexa, governada por vários genes e suas interações; encontrando nas análises genômicas uma importante ferramenta de auxílio à sua seleção nos animais *in vivo*. Ainda para um sistema eficiente e competitivo, podem-se incluir na produção suína questões como impacto ambiental, bem estar animal, praticidade (seleção genômica) e origem (rastreabilidade).

O primeiro passo na identificação de genes e de polimorfismos causais para características de importância econômica é a identificação de QTL (*Quantitative Trait Loci*) afetando tais características. Em 246 publicações sobre estudos de características quantitativas já foram identificados 5.732 QTL em suínos, correspondendo a 557 características diferentes. Nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X que são os grupos de ligação avaliados neste estudo já foram encontrados 1322, 493, 200, 150, 190, 163 e 249, respectivamente (<http://www.animalgenome.org-10/07/2010>). Com os avanços na genômica e o crescimento da importância econômica e biológica dos suínos, várias populações experimentais por meio de cruzamentos de animais de raças selvagens, naturalizadas ou exóticas com animais comerciais têm sido construídas para mapeamento de QTL e, para a busca de genes associados a características de qualidade de carne, carcaça e desempenho em suínos.

Os porcos foram introduzidos no Brasil, em 1532, por Martin Afonso de Souza, que trouxe de Portugal as raças: Alentejana, Transtagana, Galega, Bizarra, Beiroa e Macau. Essas raças portuguesas deram origem, ao longo de 400 anos de trabalho, às chamadas raças nacionais/naturalizadas, destacando-se o Piau, Tatu, Canastra, Nilo, Caruncho, Pereira e Pirapitinga (Fávero & Figueiredo, 2009). Os suínos da raça naturalizada brasileira, Piau, são caracterizados por baixo desempenho, pequeno tamanho de leitegada, rusticidade, adaptabilidade a condições pobres de manejo e alimentação e que se destacam pelo grande acúmulo de gordura subcutâneo (Guimarães & Lopes, 2001).

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

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

Dentre as técnicas que possibilitam a quantificação da expressão gênica, o método de transcrição reversa em tempo real baseado na técnica de Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (RT-qPCR), têm se mostrado uma poderosa ferramenta (Wong & Medrano, 2005). Na técnica de RT-qPCR, podem ser empregadas duas estratégias de quantificação: a absoluta ou a relativa. A quantificação relativa, ou método comparativo, baseia-se na comparação da expressão do gene alvo com a referência interna por meio dos valores de Cq (*quantification cycle*) de cada amostra (Pfaffl et al., 2002). O valor de Cq é o número de ciclos de PCR requerido para que cada curva de

amplificação alcance o limiar de detecção; sendo, específico para cada amostra e inversamente proporcional a quantidade inicial do alvo presente na reação (Bustin & Nolan, 2004). Existem vários genes de referências a serem testados e utilizados em diferentes amostras; segundo Erkens et al. (2006), os genes *ACTB* (*beta actin*), *TBP* (*TATA box binding protein*) e *TOP2B* (*topoisomerase II beta*) são adequados para normalização de genes alvos que se expressão em amostras retiradas de *Longissimus dorsi* ou de células adiposas.

Com o rápido desenvolvimento de técnicas moleculares e com a busca por uma maior eficiência e maior qualidade na produção animal, não só têm crescido o interesse pelo uso de marcadores moleculares na seleção de reprodutores, como no auxílio para identificação de paternidade e até mesmo na identificação do próprio animal.

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

Diante da grande importância da produção suína tanto no mercado interno como no mercado externo, na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, em 1998, foi desenvolvida uma população F2 por meio do cruzamento de animais da raça naturalizada Piau com animais comerciais. Esta população têm sido utilizada como referência para o mapeamento de QTL e associação de genes a características de desempenho, carcaça e qualidade de carne. Para essa população, mapas de ligação foram construídos e QTL foram mapeados no cromossomo 4 (Silva et al. 2008, 2009), no cromossomo 6 (Pires et al. 2007, 2008a,b), nos cromossomos 16, 17 e 18 (Paixão et al. 2008a,b), nos cromossomos 5, 7 e 8 (Souza et al. 2008), nos cromossomos 9, 10, 11 (Pinto et al. 2008). Polimorfismo de base única associados a características econômicas foram encontrados para o gene da leptina (Peixoto et al. 2009), hormônio de crescimento (Faria et al. 2006) e gene halotano (Band et al. 2005a,b). Em animais puros e cruzados: a expressão dos genes p53 (gene da cascata de apoptose celular) foi testada para características reprodutivas (Silva et al., 2010), o gene TLR6 (receptores *Toll-like*) foi associado a resistência à doença (Souza et al, 2010), foram feitas análise de transcriptoma (Sollero, 2010) e a expressão de genes diferencialmente expressos em

bibliotecas de cDNA foram correlacionados com gordura intramuscular (Serão et al, 2010).

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

CAPÍTULO I

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

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

Palavras-chave: raça Piau, marcador molecular, microsatélites

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

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

Key words: Piau breed, molecular marker, microsatellites

Introdução

Há décadas, a indústria de suínos procura por carcaças com alto rendimento de carne e alta estabilidade durante a estocagem; entre os consumidores, os aspectos avaliados, em relação à decisão de compra da carne são, principalmente, cor, maciez, odor e reduzida espessura de toucinho. Contudo, a drástica redução na espessura de toucinho a médio e longo prazo, causou efeitos danosos na qualidade da carne para consumo “in natura”, reduzindo a sua suculência e sabor e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade da carne suína tornou-se uma das principais metas a serem alcançadas nos programas de melhoramento.

A variação genética das características de importância econômica em suínos têm a sua origem nas diferenças entre raças ou linhas, efeitos dos genes e suas interações, e herdabilidades. Uma estratégia para determinar os locos gênicos envolvidos no controle dessas características quantitativas são os estudos por meio de associações estatísticas entre marcadores genéticos e a característica de interesse (QTL), sendo de grande aplicabilidade como informações adicionais aos programas tradicionais de seleção.

Existem muitos estudos voltados para a busca de QTL que afetam características de carcaça e de qualidade de carne em suínos (Andersson et al. 1994; Malek et al. 2001; Bidanel et al., 2001; Varona et al., 2002; Sato et al., 2003; Geldermann et al., 2003; Thomsen et al. 2004; Pires et al., 2005; Karlskov-Mortensen et al., 2005; Edwards et al., 2008a,b; Silva et al., 2008; Paixão et al., 2008a,b).

As raças naturalizadas brasileiras tiveram sua origem nas raças introduzidas pelos colonizadores Portugueses no século XVI. O suíno Piau é uma dessas raças e é caracterizada por baixo desempenho, pequeno tamanho de leitegada, rusticidade, adaptabilidade a condições pobres de manejo e alimentação e destaca-se pelo grande acúmulo de gordura subcutâneo (Guimarães & Lopes, 2001).

Neste sentido, objetivou-se com este trabalho mapear QTL associados a características de carcaça e qualidade de carne, nos cromossomos SSC1, SSC2, SSC3, SSC12, SSC14, SSC15 e SSCX de suínos de uma população F2 provenientes do cruzamento de machos da raça naturalizada Piau e fêmeas de linhagem comercial, e concluir desta forma o mapeamento dos 18 cromossomos autossômicos e do cromossomo sexual X nessa população.

Material e Métodos

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

O abate dos animais foi realizado quando o peso médio do lote atingia 65 kg ($64,9 \pm 6,0$) de peso vivo e em média aos $148,2 \pm 10,5$ dias de idade. As características de corte de carcaça, carcaça e qualidade de carne são descritos, respectivamente, nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Características de corte de carcaça avaliadas, número de observações (N), média, desvio padrão (DP).

¹ Características	N	Média	DP
PCD	538	26,83	2,880
PP	537	7,286	0,849
PPL	538	4,998	0,631
PCOPA	537	2,326	0,339
PCOPAL	538	1,679	0,265
PPA	539	4,868	0,633
PPAL	537	2,695	0,375
PC	538	3,479	0,515
PL	535	1,022	0,183
PB	538	2,683	0,480
PCOST	538	1,521	0,244
PAPADA	538	0,706	0,202
PF	540	0,220	0,041
PBR	537	0,457	0,160

¹Meia-carcaça direita (PCD), peso total pernil (PP), peso do pernil sem pele e sem capa de gordura (PPL), peso total da copa (PCOPA), peso da copa sem pele e sem capa de gordura (PCOPAL), peso total da paleta (PPA), peso da paleta sem pele e sem capa de gordura (PPAL), peso total do carré (PC), peso do lombo (PL), peso total do bacon (PB), peso das costelas (PCOS), peso total da papada (PAPADA), peso do filezinho (PF) e peso da gordura abdominal (PGA).

Tabela 2 – Características de carcaça avaliadas, número de observações (N), média, desvio padrão (DP).

¹ Características	N	Média	DP
PCARC	424	54,45	5,470
RCARC	422	0,818	0,037
MBCC	425	86,01	4,139
MLC	424	71,64	3,421
ETSH	426	40,57	5,607
ETUC	427	19,61	4,819
ETUL	425	28,34	5,902
ETL	425	23,23	6,110
ETO	425	16,83	3,731
EBACON	424	25,06	6,917
PROLOM	390	43,78	4,948
AOL	390	26,43	4,034
PULMAO	422	0,448	0,077
CORACÃO	425	0,235	0,030
FÍGADO	422	1,262	0,149
BAÇO	424	0,092	0,019
RIM	426	0,126	0,018
INTESTINO	426	18,38	1,870

¹Peso da carcaça (PCARC), rendimento de carcaça com cabeça e pés (RCARC); comprimento de carcaça pelo método brasileiro (MBCC) e pelo método americano (MLC); espessura de toucinho (ET) nas posições:SH (maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar), UC (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar), UL (espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar), L (menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar); ETO (espessura de toucinho, a 6,5 cm da linha dorso-lombar); espessura do bacon (EBACON), medida imediatamente após a última costela, na altura da divisão carré-bacon; PROFLOMB (profundidade de lombo, diâmetro do músculo *Longissimus dorsi* sobre uma reta traçada da coluna vertebral serrada até a posição onde foi medida a ETO), área de olho de lombo (AOL) medida em triplicata, com auxílio de um planímetro, no decalque vegetal tomado da seção transversal do músculo *Longissimus dorsi*, na altura da última costela.

Tabela 3 – Características qualidade de carne avaliadas, número de observações (N), média, desvio padrão (DP).

¹ Características	N	Média	DP
pH45	390	6,534	0,276
pH24	417	5,704	0,126
L	426	45,12	1,947
A	424	0,693	0,722
B	426	6,636	0,558
GOINTR	389	1,549	0,541
PGOTEJ	427	3,157	1,743
PCOZ	426	32,46	2,512
MACIEZ	391	5505,95	958,73
PTOT	427	35,66	3,472

¹pH medido aos 45 minutos, (pH45), pH24 horas *post-mortem* (pH24); maciez objetiva (força de cisalhamento - MACIEZ), gordura intramuscular (GORINT); capacidade de retenção de água: perda por gotejamento (GOTEJ), perda por cozimento (COZ) e perda de peso total (PTOT); A coloração foi determinada pelo sistema HUNTER LAB, sendo medidos a luminosidade: (L), o índice de vermelho (A) e o índice de amarelo (B), em espectrofotômetro COLORQUEST II, de acordo como descrito por Benevenuto Júnior (2001).

O DNA de 20 animais parentais, 62 animais F1 e, em média, 450 animais F2 foi extraído de sangue coletado imediatamente após o abate utilizando-se o método de extração por precipitação com sal (Miller et al., 1988). As soluções de DNA para uso foram diluídas na concentração de 25 ng / μ L em solução de Tris_EDTA (Tris-HCL 10 mM- pH 8,0 e EDTA 1 mM- pH 8,0) e foram mantidas em geladeira a 4°C. A subsequente análise do DNA genômico foi feita no Laboratório de Genético Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

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

As amplificações dos animais foram feitas em termocicladores MJ Research PTC 100-96, utilizando QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, C.A., EUA). A declaração dos alelos foi feita utilizando-se o software GenScan e Genotyper (Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA). A eletroforese capilar foi realizada por meio de sequenciador automático ABI PRISM 3700.

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

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

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

A determinação dos limiares de significância cromossômica ($\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$) foi feita no software GridQTL, com 10.000 permutações (Churchill & Doerge, 1994) e foi representada por $P_c < 0,01$ para a 1% e $P_c < 0,05$ para 5%. Os limiares genômicos foram obtidos por meio da correção de Bonferroni (Knott et al., 1998). O intervalo de confiança a 95% (IC95%) para a localização do QTL foi obtido usando a aproximação de Qui-quadrado (χ^2); e a fração aditiva da variância fenotípica (h_Q^2) explicada pelo QTL foi feita conforme descrito por Pérez-Enciso et al. (2000). O seguinte modelo estatístico foi ajustado aos dados:

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

Em que y_{ijkl} é o fenótipo do suíno l do sexo i com genótipo k pertencente ao lote de nascimento j ; S_i é o efeito fixo de sexo i , $i = 1$ (macho), 2 (fêmea); L_j é o efeito fixo de lote j , $j = 1, 2, 3, 4, 5$; H_k é o efeito fixo do genótipo do halotano k , $k = 1$ (NN), 2 (Nn, portador); $(C_{ijkl} - \bar{C})b$ é o ajustamento para as covariáveis (peso da carcaça no abate usada como covariável para as características carcaça; peso da carcaça direita para as características de corte de carcaça e, idade ao abate para as características de qualidade); $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$ é o resíduo.

O valor c_a e c_d são as covariáveis associadas aos efeitos aditivos (a) e de dominância (d), sendo tais efeitos função das probabilidades condicionais do QTL, dado o genótipo dos marcadores, e é calculado da seguinte forma:

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

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

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

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

A representação gráfica dos cromossomos foi feita no programa MAPCHAT (<http://mapchat.ca/>) a partir dos mapas de ligação construídos pelo programa CRIMAP e do banco de dados on line Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nessa representação, os genes candidatos foram selecionados com base em sua função em relação ao desenvolvimento muscular e metabolismo e / ou sua associação com características de qualidade da carne (Ensembl e literatura pesquisada). Vários desses genes estão atualmente sob investigação.

Resultados e Discussão

Os 35 marcadores microssatélites utilizados para o mapeamento dos cromossomos dos 20 animais parentais, 64 animais F1 e em média 450 animais F2, com seus respectivos número de alelos e conteúdo de informação polimórfica (PIC) estão apresentados na Tabela 4.

A distância média entre os marcadores foi de 30 cM, explicada pela dificuldade de se identificar marcadores polimórficos em algumas regiões dos cromossomos avaliados

na população estudada. Com exceção do SSC1 que foi mapeado a partir da região central do cromossomo; na maioria dos demais cromossomos, os mapas, geralmente estavam de acordo com o mapa do USDA-ARS considerado como referência (<http://www.marc.usda.gov/genome/swine/swine.html>).

Tabela 4- Identificação, posição nos cromossomos, número de alelos segregantes e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador.

Marcador	Chr ¹	Pos ²	Alelos	PIC	Marcador	Chr ¹	Pos ²	Alelos	PIC
SW781	1	55	3	0,44	SW1962	12	91	4	0,60
SW2035	1	71	4	0,60	S0106	12	113	7	0,81
S0113	1	80	3	0,54	SW857	14	0	7	0,78
SWR982	1	84	3	0,56	SW210	14	45	6	0,56
S0112	1	120	4	0,63	SW761	14	86	4	0,44
SW2423	2	0	6	0,79	SW2515	14	125	5	0,48
SW240	2	48	7	0,70	S0355	15	0	4	0,43
SW395	2	70	5	0,66	S0004	15	29	3	0,39
SW1883	2	98	3	0,35	SW1989	15	64	6	0,69
S0036	2	150	4	0,67	SW1316	15	88	5	0,71
SW2021	3	0	6	0,75	SW936	15	100	5	0,74
S0206	3	39	5	0,59	SW1262	15	130	3	0,51
SW902	3	65	4	0,57	SW949	X	0	6	0,63
S0002	3	112	7	0,79	SW980	X	15	4	0,48
SW717	3	134	4	0,63	SW2126	X	38	3	0,52
SW2494	12	0	3	0,45	SW1943	X	90	3	0,49
SW957	12	24	6	0,64	S0218	X	120	3	0,38
SW168	12	61	4	0,68					

¹Chr = cromossomo, ²Pos = posição em cM.

Todos os marcadores utilizados neste trabalho podem ser considerados eficientes nos estudos de características quantitativas, pois a aplicabilidade dos marcadores possui relação direta com o grau de polimorfismo dos mesmos (Tabela 4). E os marcadores do presente estudo foram classificados como moderadamente polimórficos com $0,25 < \text{PIC} < 0,5$ ou considerados altamente polimórficos, com $\text{PIC} > 0,5$ (Botstein et al., 1980).

Os limiares de significância para testar o modelo com efeito aditivo e de dominância foram de 8,30 e 10,06 respectivamente a 5% ($P < 0,05$) e 1% ($P < 0,01$) para os cromossomos autossômicos e de 13 e 16,35 para o cromossomo sexual. Sete QTL foram encontrados associados a diferentes características de carcaça, cinco QTL para

características de corte de carcaça e seis QTL para características de qualidade de carne (Tabela 5). Desses 18 QTL, encontrou-se um para perda de cozimento (PCOZ) no SSC1, significativo em nível de 5% genômico.

Tabela 5- Informações dos QTL significativos com seus efeitos aditivos (a), de dominância (d), erro padrão (EP), variância aditiva do QTL e intervalo de confiança.

Cromossomo	Características ¹	F	Pos ²	a (EP)	d (EP)	$h^2_{q^3}$	IC ⁴
1	PCOZ	8,6***	71	-0,723(0,177)	0,073(0,265)	5,48	65-75
1	PTOT	6,1*	71	-0,812(0,248)	0,540(0,371)	3,64	62-75
2	PL	5,87*	0	-0,005(0,011)	0,062(0,1845)	0,05	0-22
2	PROFLOMB	7,53**	31	-2,043(0,547)	0,42 (0,1,14)	9,91	17-45
2	AOL	6,43*	31	-1,419(0,402)	0,001 (0,84)	8,89	15-46
2	pH45	7,76**	89	-0,116(0,029)	0,015 (0,547)	9,41	85-120
3	PP	7,41**	37	0,068 (0,033)	-0,192 (0,015)	1,68	28-56
12	SH	6,7*	92	-1,140(0,454)	-2,023 (0,711)	2,79	89-99
14	PPL	5,34*	18	-0,132(0,043)	-0,086 (0,071)	5,82	0-38
14	INTEST	7,27**	107	-0,129(0,201)	1,340 (0,359)	0,27	90-127
15	ETL	6,73*	88	0,979(0,952)	1,704 (0,598)	1,72	76-92
15	SH	7,55**	100	1,004 (0,36)	-1,21 (0,543)	2,17	66-115
15	AOL	7,95**	112	-1,359(0,356)	-0,415(0,638)	8,18	97-127
15	PCOPAL	6,36*	88	-0,049(0,015)	0,0315(0,021)	3,04	71-98
15	PPAL	5,6*	88	-0,058(0,024)	-0,083 (0,033)	1,86	76-96
15	GOTEJ	6,78*	101	-0,416(0,130)	-0,469 (0,199)	3,08	94-115
X	L*	10,5**	111	-0,624(0,192)	-	5,25	100-120
X	A*	11,9**	111	0,254 (0,073)	-	6,07	97-130

*,** e *** significativo a 5% e 1% nível cromossômico, e a 5% nível genômico, respectivamente;

¹PROFLOMB – profundidade de lombo (mm), AOL – área de olho de lombo, (cm²), SH – maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar (mm), INTEST – comprimento total do intestino delgado(m), ETL – menor espessura de toucinho medida na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso lombar (mm), PL – peso do lombo (Kg), PP – peso do pernil (Kg), PCOPAL – peso da copa sem pele e sem gordura (KG), PPL – peso do pernil sem pele sem gordura (Kg), PPAL – peso da paleta sem pele sem gordura (Kg), A – índice de vermelho, COZ – perda por cozimento (%), PTOT – perda de peso total (perda de peso total = perda de peso por gotejamento + perda de peso por cozimento), (%), pH45-pH45 minutos, GOTEJ – perda por gotejamento (%) e L – luminosidade;

²posição em cM; ³fração aditiva da variância fenotípica explicada pelo QTL ($h^2_q = a^2/2\sigma^2_Y$) em %;

⁴intervalo de confiança em cM.

Para satisfazer as exigências dos consumidores, nas últimas décadas, as pesquisas na área de melhoramento genético de suínos vêm sendo desenvolvidas no sentido de diminuir a espessura de toucinho e obter maior porcentagem de carne magra na carcaça dos animais; o que não foi uma tarefa difícil para seleção convencional, uma vez que as

correlações genéticas entre características de carcaça e espessura de toucinho são negativas. No presente trabalho, QTL para características de carcaça e corte de carcaça foram associados em sua maioria, aos alelos da linhagem comercial (Tabela 5), animais que passaram por um processo de seleção para acúmulo de carne magra na carcaça.

No SSC2 existem vários genes que podem influenciar direta ou indiretamente o desenvolvimento muscular em suínos e os QTL do presente trabalho se localizaram sobre ou próximos a eles (Figura 1). Na região proximal do SSC2, localiza-se o gene IGF2 (*fator de crescimento semelhante a insulina 2*), gene com *imprinting* paterno, candidato a afetar crescimento muscular e deposição de gordura em suíno e nesta região encontrou-se o QTL para Peso do Lombo ($F=5,87$, $a=-0,005$; $h_o^2=0,05$; $P_c<0,05$, IC=0-22 cM). Duthie et al. (2008), em cruzados Pietrain, Large White, Landrace e Leicoma (IC=0-9,8 cM), Sanchez et al. (2006) em suínos comerciais (0 cM) e Milan et al. (2002) em Meishan x Large White (IC=0-18 cM) também encontraram QTL para Peso do Lombo na região proximal do SSC2. Nezer et al. (1999), também nesta região do SSC2, encontraram QTL para porcentagem de lombo (IC=0 a 23,7 cM) em cruzados Large White X Pietrain.

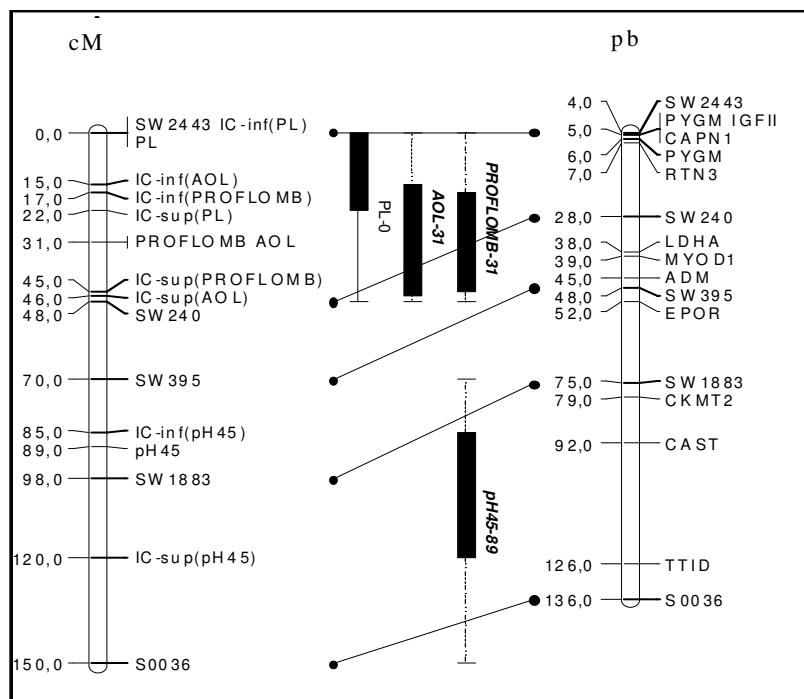


Figura 1 – Representação gráfica dos QTL (barra vertical escura) encontrados no SSC2, seus intervalos de confiança (linha vertical pontilhada) e os marcadores que os delimitam em centiMorgan - cM que são interligados com suas respectivas posições no mapa em pares de base - pb (linhas perpendiculares). Genes candidatos a influenciar características de importância econômica em suínos, também estão representados: IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina 2), PYGM (fosforilase, glicogênio, músculo), CAPN1 (calpaína 1), RTN3 (reticulona 3), LDHA (lactato desidrogenase A), MYOD1 (diferenciação miogênica 1), ADM (adrenomedulina), EPOR (receptor de eritropoietina), CKMT2 (creatina quinase mitocondrial 2), CAST (calpastatina) e TTID (miotilina).

Ainda no SSC2, encontrou-se QTL para PROFLOMB ($F=7,53$; $a=-2,043$; $P<0,01$, $IC=17-45$) e AOL ($F=6,43$; $a=-1,419$; $P<0,05$, $IC=15-46$), contudo localizados mais próximo do gene MYOD1 (Figura 1); gene pertencente a família MyoD (myo-DI, myf-5, miogenina e myf-6 ou mfr-4), candidato a influenciar o desenvolvimento dos músculos em mamíferos. Esses QTL localizaram-se na mesma região do cromossomo entre os marcadores SW2443 e SW240, podendo se tratar de um QTL com efeito pleiotrópico, ou seja, a variação de um gene se traduz em vários efeitos fenotípicos (Figura 1) e explicaram consideravelmente a variação fenotípica da característica de 9,91% e 8,89%, respectivamente (Tabela 5).

Liu et al. (2007), em região similar do SSC2, encontraram QTL para AOL (20,7 cM) entre os marcadores SW2443 e SW2157 em animais formados pelo cruzamento de suínos Duroc e Pietrain; enquanto Lee et al. (2003), encontraram QTL para AOL

associado aos marcadores SW240 e gene MYOD (IC=42-57,4 cM). Próximo ao marcador SW395, usado no presente estudo, mas não associado a QTL, Varona et al. (2002) encontraram QTL para PROLOMB (IC=45-81) e AOL (IC=61-80) em uma população formada pelo cruzamento de três varrões da raça Ibérica com 31 fêmeas Landrace.

A variação na localização do QTL para mesma característica ou ausência do QTL em diferentes populações se deve ao fato que os estudos de mapeamento são feitos em populações com distintas composições genéticas e/ou diferentes marcadores, assim o alelo do(s) gene(s) associado a um QTL pode ser diferente ou alelo-QTL pode não estar em fase de desequilíbrio de ligação com os marcadores avaliados nos diferentes estudos. Assim, apesar dos QTL possibilitarem a localização no genoma dos animais, da região onde existem genes associados a características quantitativas, é necessário que este seja validado em populações comerciais para serem usados em programas de seleção.

Os QTL mapeados no SSC15 localizaram-se na região distal do cromossomo (Figura 2). O QTL para AOL ($F=7,95$; $a=-1,359$; $P<0,01$) localizou-se no intervalo de 97 a 127cM, entre os marcadores SW936 e SW1262, explicando consideravelmente a variação fenotípica da característica ($h^2_q=8,48\%$); em região similar, Liu et al. (2007), encontraram QTL para AOL, em cruzados Duroc e Pietrain, entre os marcadores SW936 e SW119 (IC=88,5-119,9). Em região anterior ao QTL do presente trabalho, Edwards et al. (2008b), em uma população F2 formada por machos Duroc e fêmeas Pietrain, encontraram QTL para AOL (IC=34,6-65,1 cM), entre os marcadores S0148 e S0088. Também em região anterior, Wimmers et al. (2007), encontraram QTL para AOL (IC=39,8-88,5), entre os marcadores SW1111 e SW936.

QTL significativos em nível de 5% cromossômico explicando 3,04% da variação fenotípica de PCOPAL ($F=6,36$) e QTL explicando 1,86% da variação fenotípica de PPAL ($F=5,6$) também foram encontrados no SSC15 (88 cM), entre os marcadores SW1989 e SW936, indicando que nesta região pode haver um QTL pleiotrópico (Figura 2). Um possível gene candidato associado a esses QTL é o gene da Myostatina/GDF8 (fator de diferenciação 8); uma vez que a miostatina regula a proliferação dos mioblastos durante o período embrionário e ajusta o crescimento da musculatura esquelética durante e após o período embrionário (Sonstegard et al., 1998).

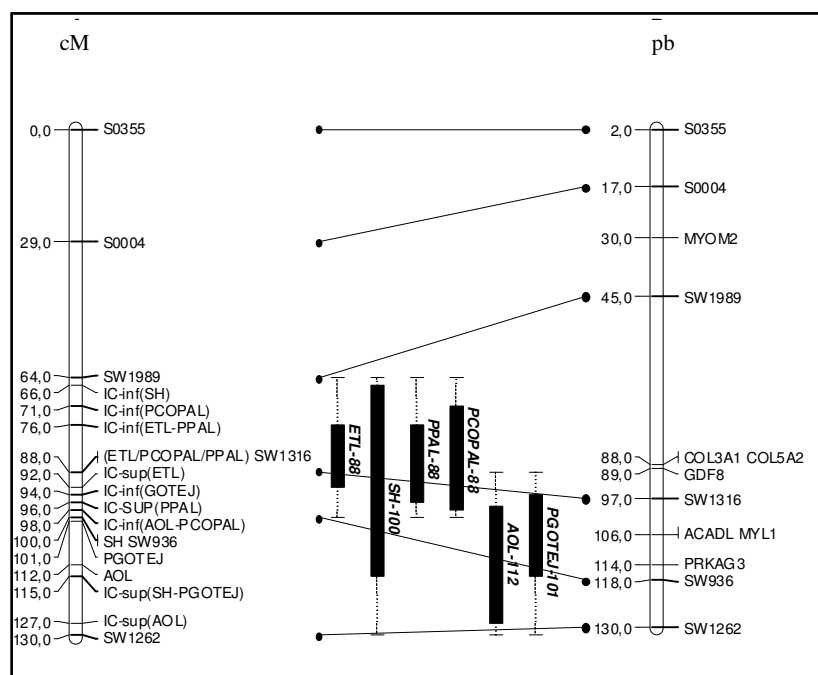


Figura 2 – Representação gráfica dos QTL (barra vertical escura) encontrados no SSC15, seus intervalos de confiança (linha vertical pontilhada) e os marcadores que os delimitam em centiMorgan - cM que são interligados com suas respectivas posições no mapa em pares de base – pb (linhas perpendiculares). Genes candidatos que influenciam características de importância econômica em suínos, também estão representados: MYOM2 (myomesina 2, proteína-M), COL3A1 (colágeno, tipo III, alfa 1), COL5A2 (colágeno, tipo V, alfa 2), GDF8 (fator de diferenciação 8), ACADL (acil-CoA dehidrogenase, cadeia longa), MYL1 (miosina, cadeia leve 1), e PRKAG3 (proteína quinase ativada por AMP, subunidade não catalítica gama 3).

Ainda no SSC15, encontrou-se um QTL para ETL ($P_c < 0,05$; $a = 0,979$; $h^2_q = 1,72$) entre os marcadores SW1989 e SW936 ($IC = 76-92$) e um QTL para SH ($P_c < 0,01$; $a = 1,004$; $h^2_q = 2,17$) entre os marcadores SW1989 e SW1262 e como era esperado, foram associados aos alelos da raça Piau, suíno tipo banha. O intervalo de confiança para o QTL SH foi amplo, de 66 a 115 cM, podendo se tratar de mais de um QTL. Na região entre os marcadores SW1111 e o marcador SW936 (marcador que também delimitou o QTL para ETL no presente estudo), Liu et al. (2007), em população formada por Duroc e Pietrain, encontraram QTL para espessura de toucinho ($IC = 39,8-88,5$ cM).

QTL para PP ($h^2_q = 1,68$; $P_c < 0,01$; $IC = 28-56$) foi encontrado no SSC3 entre os marcadores S0206 e SW902. Em região similar, Stratil et al. (2006), em população formada por Meishan x Pietrain, encontraram QTL para PL. Nesta região do SSC3 encontram-se os genes ASPN (asporina) e OGN (osteoglicina), genes pertencentes a

família SLRP (proteoglicanos ricos em leucinas pequenas), que possuem papéis importantes na fibrilogênese do colágeno, crescimento, diferenciação e migração celular (Tasheva et al. 2004). Beeckmann et al. (2003), em região anterior, encontraram QTL para PP entre os marcadores SW72 e S0206 (IC=17,8-42,3 cM) em família Meishan x Pietrain.

QTL para PPL foi encontrado na região proximal do SSC14 a 18 cM ($h^2_q = 5,82$; $P_c < 0,05$) entre os marcadores SW857 e SW210. Próximo ao marcador SW210 (78 pb) encontram-se os genes ACTA1 (actina alfa 1) localizado a 62 pb e ACTA2 (actina 2 de músculo liso) a 105 pb, genes envolvidos na formação de filamentos musculares que são importantes componentes do citoesqueleto. Em região mais distal do SSC14, Dragos- Wendrich et al. (2003) encontraram QTL para PP a 65,4 cM ($h^2_q = 4,9$; $P_c < 0,05$) em família Meishan x Pietrain, entre o gene ACTA1 e o marcador SW488 e a 74,5 cM ($h^2_q = 5,5$; $P < 0,01$) em família de suínos selvagem europeu x Pietrain, entre os marcadores SW210 e SW2488. No SSC14, encontrou-se também um QTL para intestino ($h^2_q = 0,27$; $a = -0,1291$; $P_c < 0,01$).

QTL para espessura de toucinho SH ($h^2_q = 2,79$; $a = -1,140$; $P_c < 0,05$) também foi encontrado no SSC12, entre os marcadores SW1962 e S0106 (IC=89-99 cM), contudo, inesperadamente, associado aos alelos da raça comercial; animais que apresentaram, à exceção da espessura de toucinho na última costela (ETUC), uma redução ($p < 0,05$) média de 39% nas demais espessuras de toucinho avaliadas em relação aos animais Piau (Benevenuto Júnior, 2001). Na região distal do SSC12, Liu et al. (2007), também encontraram QTL associado com espessura de toucinho (101,2 cM) em cruzados Duroc x Pietrain (IC=64,7-108,3 cM). Neste cromossomo, encontra-se o gene GH (*hormônio do crescimento*) candidato a influenciar várias características de importância econômica em suínos.

Faria et al. (2006) na mesma população utilizada no presente estudo, encontraram um polimorfismo no gene GH (G316A) associado com o número de tetas direita ($p = 0,03$), peso do coração ($p = 0,04$), peso do pulmão ($p = 0,05$), comprimento de carcaça ($p = 0,04$), peso total da paleta ($p = 0,07$), peso da papada ($p = 0,01$), pH medido 24 horas *pos-mortem* ($p = 0,03$) e perda por gotejamento ($p = 0,01$). Corroborando com estes resultados, Paixão et al. (2008a,b) encontraram nessa população QTL para número de tetas, pulmão e coração no SSC16; Pires et al. (2006) constataram QTL para comprimento de carcaça no SSC6; Silva et al. (2008) QTL para peso da paleta e peso

do coração no SSC4 e, neste trabalho foi encontrado QTL para peso da paleta e perda de gotejamento no SSC15.

Apesar da correlação entre gordura subcutânea (espessura de toucinho) e intramuscular ser baixa, em torno de 0,20 (Peloso, 2006), a médio e longo prazo, essa redução poderá ter efeitos danosos na qualidade da carne para consumo “*in natura*”, reduzindo a sua suculência e sabor; assim, outro objetivo do melhoramento de suínos, além da produção de carne magra, é melhorar a qualidade desta. Contudo, o melhoramento dessa característica complexa, por meio da seleção convencional, encontra dificuldades, uma vez que muitas características que a compõem têm que ser avaliadas após o abate, encontrando nas análises genômicas uma importante ferramenta de auxílio na seleção dos animais *in vivo*. No presente estudo, encontramos importantes QTL associados a qualidade da carne suína para perda de água na carne nos SSC1 e SSC15, pH45 no SSC2 e cor no SSCX.

As correlações genéticas e fenotípicas entre rendimento de carne e gordura intramuscular são negativas e moderadas, e segundo Brewer et al. (2001), o teor de gordura intramuscular (GIM) em *Longissimus dorsi* em suínos é correlacionado com propriedades sensoriais da carne. Uma das alternativas para solucionar o problema da qualidade da carne suína é o uso em cruzamentos comerciais, de linhagens ou raças que proporcionem aumentar o conteúdo de GIM na carcaça das progênies. Maior conteúdo de GIM também possibilita a produção de presuntos de longa maturação, nicho de mercado brasileiro a ser explorado. Segundo Sabbioni et al. (2004), a carne de suínos destinada à produção de presuntos de longa maturação deve possuir alta concentração de gordura intramuscular e espessura regular de toucinho no pernil, preferencialmente maior que 8 mm.

Não foi encontrado QTL para gordura intramuscular no presente estudo devido ao teor relativamente baixo (1,59% + 0,46%) desta gordura no músculo *Longissimus dorsi* dos animais da geração F2, pois os animais foram abatidos (aproximadamente 65 Kg) antes que a deposição de gordura na carcaça e no músculo *Longissimus dorsi* ganhassem ímpeto (Benevenuto Júnior, 2001). Análises de variância nos grupos genéticos Piau, linhagem Comercial e animais F1 abatidos aos 120 Kg apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) para o conteúdo de gordura intramuscular quando comparou Piau e cruzados com os animais da linhagem comercial (Serão et al, 2010). E no presente estudo, os alelos da raça Piau não foram associados com perda de água na carne, uma vez que os animais da linhagem comercial apresentaram perda de peso total

da carne (gotejamento + cozimento) 10,81% maior que os animais naturalizados (Benevenuto Júnior, 2001).

Sugerindo-se assim, que a raça Piau poderia ser candidata a ser usada em cruzamentos comerciais para melhoria da qualidade de carne suína em termos de gordura intramuscular, retenção de água, produção de presuntos; mostrando-se, portanto, como um banco de variabilidade genética a ser explorado em programas de melhoramento. Sollero et al. (2008) estimaram a diversidade genética dentro e entre cinco grupos genéticos de suínos ($n = 182$): três raças naturalizadas (Moura, Piau e Monteiro), uma raça comercial (Landrace) e um composto comercial (MS60), com 28 marcadores microssatélites e mostraram que 14% da variação total observada ($P < 0,001$) foi devido às diferenças entre as raças.

Dentre os indicadores de qualidade de carne, as medidas de CRA (perda por gotejamento, cozimento e total) da população F2 do presente estudo apresentaram correlação significativa ($p < 0,01$) com pH45, sendo os coeficientes de correlação de -0,66, -0,17 e -0,44, respectivamente, com PGOTEJ, PCOZ e PTOT. O QTL para PCOZ ($F = 8,6$; $h^2_q = 5,48$; $a = -0,783$; $P < 0,05$) localizou-se a 71 cM no SSC1 e como era esperado, foi encontrado também um QTL para $PTOT = PGOTEJ + PCOZ$ ($F = 6,76$; $h^2_q = 3,64$; $a = -0,890$; $P < 0,05$) a 71 cM (Figura 3), uma vez que PCOZ e PTOT apresentaram alta correlação ($r = 0,84$) (Benevenuto Júnior, 2001).

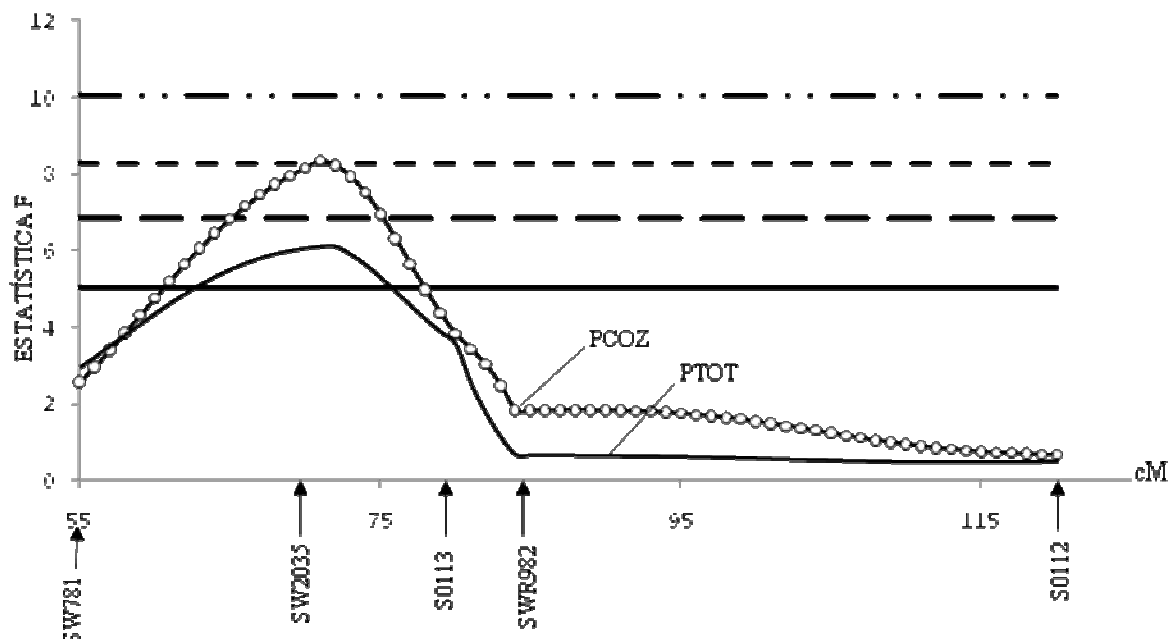


Figura 3 - Estimativas dos valores de F para perda por cozimento (PCOZ) e perda de peso total (PTOT) no SSC 1. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (---), 5% em nível genômico (-.-) e 1% em nível genômico (-.-.-). A posição dos marcadores é indicada por setas.

Segundo Jennen et al. (2007), AK1 (adenilato quinase 1), ATP5A1 (ATP sintase, transportador de H⁺, complexo mitocondrial F1, subunidade alfa 1, músculo cardíaco), CAPN3 (calpaína 3), IGF1R (receptor do fator de crescimento semelhante a insulina), TPM1 (tropomiosina 1), TPM2 (tropomiosina 2) são potenciais genes candidatos a influenciar QTL para características de qualidade de carne suína no SSC1 e, a posição desses genes em relação aos QTL encontrados no presente estudo estão representados na Figura 4. Liu et al. (2007) encontraram QTL para pH e cor da carne na região do MC4R em cruzados Duroc-Pietrain. Vidal et al. (2006) encontraram associação do gene ME1 (*enzima málica 1*) com espessura de toucinho e pH muscular em suínos Landrace; essa enzima tem uma forte influência no GIM e grandes diferenças na sua atividade têm sido encontrada entre suínos Landrace e Ibérica (Morales et al., 2002). Malek et al. (2001) encontraram QTL para GOTEJ na região distal do SSC1 (90 cM) para uma população formada por Berkshire x Yorkshire.

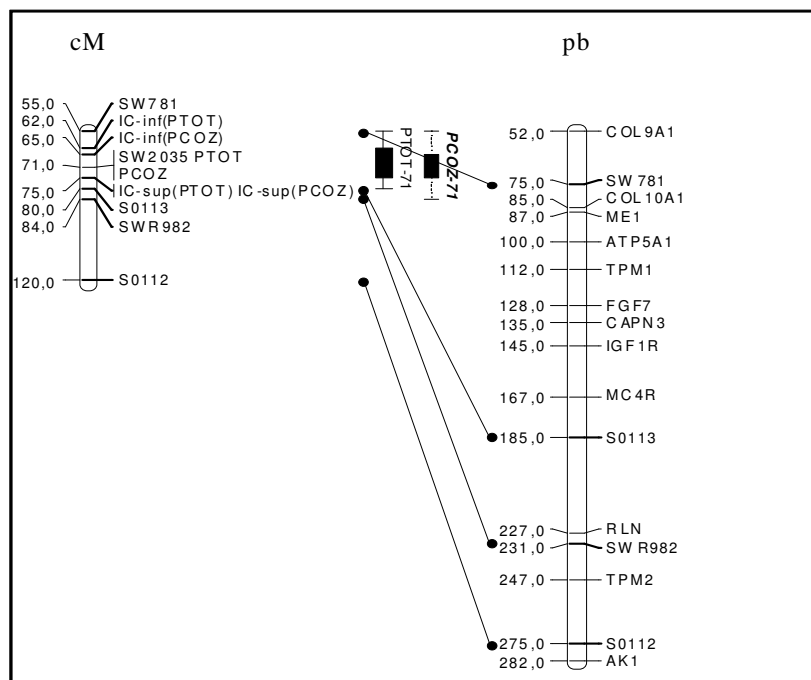


Figura 4 – Representação gráfica dos QTL (barra vertical escura) encontrados no SSC1, seus intervalos de confiança (linha vertical pontilhada) e os marcadores que os delimitam em centiMorgan - cM que são interligados com suas respectivas posições no mapa em pares de base - pb (linhas perpendiculares). Genes candidatos a influenciar características de importância econômica em suínos, também estão representados: COL9A1 (colágeno, tipo IX, alfa 1), COL10A1 (colágeno, tipo X, alfa 1), ME1 (enzima málica 1), ATP5A1 (ATP sintase, transportador de H⁺, complexo mitocondrial F1, subunidade alfa 1, músculo cardíaco), TPM1 (tropomiosina 1), FGF7 (fibroblasto fator de crescimento 7), CAPN3 (calpaína 3), IGF1R (receptor de crescimento semelhante a insulina), MC4R (receptor de melanocortina4), RLN (precursor de prorelaxina), TPM2 (tropomiosina beta 2) e AK1 (adenilatoquinase 1).

Perda por gotejamento (PGOTEJ) e as demais características de qualidade relacionadas com CRA na carne são complexas características quantitativas, influenciadas por muitos genes e suas interações, entre os poucos genes de alto efeito (*major genes*) conhecidos a influenciar essas características, podemos citar, os genes RYR1 (*receptor de rianodina 1*) no cromossomo 6 (Fujii et al. 1991) e RN (*Rendimento de Napole*) no cromossomo 15 (Milan et. al., 2000).

No SSC15, encontrou-se um QTL para GOTEJ localizado na região distal do cromossomo a 101 cM (Figura 2) ($F=6,78$; $h^2_q=3,08$; $a=-0,416$; $P<0,05$), próximo ao marcador SW936, região onde se encontra o gene RN/ PRKAG3 (proteína quinase ativada por AMP, subunidade não catalítica gama 3), candidato a influenciar esse QTL;

uma vez que diferentes substituições não sinônimas deste gene: T30N, G52S, L53P, 1199V e R2001, foram associadas com pH, cor e capacidade de retenção de água na carne suína (Milan et al, 2000; Ciobanu et al., 2001). A região desse QTL correspondeu a QTL anteriormente descritos para pH da carne, conteúdo de glicogênio, potencial glicolítico, reflectância, ternura e sabor da carne (Ciobanu et al. 2001; Malek et al. 2001). QTL para PGOTEJ no SSC15 (89 cM) na região do gene RN, entre os SW936 e SW906 também foi encontrado por Bertram et al. (2000) em suínos da raça Dansh. Thomsen et al. (2004) encontraram QTL para PGOTEJ a 65 cM em Berkshire X Yorkshire e, Rohrer et al. (2005) a 57 cM, entre Duroc X Landrace. Edwards et al. (2008b) encontraram QTL para perda por cozimento a 92,5 cM no SSC15.

Segundo Lindahl et al. (2001), o aumento no teor de lipídeos leva a um aumento na concentração de metamioglobina (MMb), o que levaria a um aumento nos índices de vermelho (A^*) e diminuição na luminosidade (L^*); corroborando com essas afirmativas, encontrou-se um QTL para A^* ($F=11,9$, $h^2q=6,07$; $a=0,25$; $P_c<0,05$) associado aos alelos da raça Piau, tipo banha e um QTL para L^* ($F=10,5$; $h^2q=5,25$; $a=-0,624$; $P_c<0,01$) associados aos alelos da linhagem comercial, ambos a 111 cM no SSCX. QTL para A^* no SSCX também foram encontrados por Pérez-Enciso et al. (2002) a 50 cM em Ibéricos X Landrace e, Ma et al. (2009) encontraram QTL para A^* a 87 cM que também encontraram QTL para L^* a 81,3 cM em Duroc X suínos chineses Erhualian.

Outra tentativa para melhorar a qualidade de carne seria a seleção dentro de populações comerciais, de animais com genes favoráveis para qualidade da carne, tornando o QTL para pH45 encontrado no presente estudo, associado aos alelos da linhagem comercial na região distal do SSC2 ($F=7,76$; $h^2q=9,41$; $a=-0,116$; $P_c<0,01$), um candidato a maiores estudos (Figura 1). O pH45 dos animais F2 foi, em média, de 6,53, variando de 5,2 a 7,0 (Benevenuto Júnior, 2001).

Segundo Jennen et al. (2007), CAST (calpastatina), CKMT2 (creatina quinase, mitocondrial 2), IGF2, LDHA (lactato desidrogenase A), MYOD1, PYGM (fosforilase, glicogênio, músculo), TTID (miotilina) são genes candidatos localizados no SSC2 a influenciar características pH e perda por gotejamento na carne suína e estão representados na Figura 1. Wimmers et al. (2007) encontraram, após análises de expressão (Microarranjo, RT-qPCR) e de polimorfismo, o gene *EPOR* (*receptor de eritropoietina*) como candidato a influenciar pH 24 horas *post mortem* ($P<0,003$) e perda por cozimento em *Longissimus dorsi* em suínos cruzados Duroc e Pietrain. Lee et al. (2003) encontraram QTL para pH 24 na região distal do SSC2 (73 cM).

Conclusões

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

As informações dos QTL significativos detectados neste estudo serão úteis para estudos de mapeamento fino e identificação de genes/polimorfismos para aumentar a eficiência na seleção e melhor entendimento das características produtivas em suínos. Encontrando-se nas raças naturalizadas um campo de variabilidade a ser explorado nos programas de melhoramento.

Agradecimentos

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

Literatura Citada

- ANDERSSON, L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H. et al. Genetic mapping of quantitative traitloci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.263, p.1771-1774, 1994.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.8, n.1, p.88-91, 2005a.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress Syndrome gene and carcass and performance trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.8, n.1, p.92-96, 2005b.
- BEECKMANN, P.; SCHRÖFFEL JR, J.; MOSER, G. et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* Chromosome 3. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, p.20–27, 2003.
- BENEVENUTO JÚNIOR, A. A. **Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados**. Viçosa: Universidade

- Federal de Viçosa, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- BIDANEL, J.P.; MILAN, D.; IANNUCELLI, N. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Genetics Selection Evolution**, v.33, p.289–309, 2001.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BREWER, M.S.; ZHU, L. G.; MCKEITH, F. K. Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. **Meat Science**, V.59, P.153–163, 2001.
- CIOBANU D.; BASTIAANSEN J.; MALEK M., et al. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate activated $\gamma 3$ subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. **Genetics**, v.159, p.1151–1162, 2001.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v138, p.963-971, 1994.
- DRAGOS-WENDRICH, M.; MOSER, G.; BARTENSCHLAGER, H. et al. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 10. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, n.1, p.82–88, 2003.
- DUTHIE, C.; SIMM, G.; DOESCHL-WILSON, A. et al. Kalm E, Knap PW, Roehe R. Quantitative trait loci for chemical body composition traits in pigs and their positional associations with body tissues, growth and feed intake. **Animal Genetics**, v.39, n.2, p.130-140, 2008.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.634-640, 2006.
- EDWARDS, D.B.; ERNST, C.W.; TEMPELMAN, R.J. et al. Quantitative trait loci mapping in an F2 Duroc x Pietrain resource population: I. Growth traits. **Journal Animal Science**, v.86, p.241-253, 2008a.
- EDWARDS, D.B.; ERNST, C. W., RANEY, N. E. et al. Quantitative trait locus mapping in an F2 Duroc x Pietrain resource population: II. Carcass and meat quality traits. **Journal Animal Science**, v.86, p.254-266, 2008b.

- FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, v.253, p.448–51, 1991.
- GELDERMANN, H.; MÜLLER, E.; MOSER, G. et al. Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, p.363–393, 2003.
- GOODWIN, R.N. (2000) Genetics and pork quality. **Proceedings of Quality and Safety Summit**. July 11-12. National Pork Producers Council. Des Moines, IA.
- GREEN, P.; FALLS, K. e CROOKS, S. **Documentation for CRIMAP**, St. Louis, Mo.: Washington Univ. School of Medicine. <http://linkage.rockefeller.edu/soft/crimap>. 1990.
- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, v.15, n.3, p.27-28, 2001.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S. A.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.136, p.1195–1207, 1994.
- JENNEN, D.G.J.; BRINGS, A.D.; LIU, G. Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.124, p.2-11, 2006.
- LINDAHL, G.; LUNDSTROM, K.; TORNBERG, E. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. **Meat Science**, v. 59, p.141-151, 2001.
- LEE, C.; CHUNG, Y.; KIM, J.H. Quantitative trait loci mapping for fatty acid contents in the backfat on porcine chromosomes 1, 13, and 18. **Molecular Cells**, v.15, n.1, p.62-7, 2003.
- LIU, G.; JENNEN, D. G. J.; THOLEN, E. et al. A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. **Animal genetics**, v.38, n.3, p. 241-52.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1006, 2007.
- KARLSKOV-MORTENSEN, P.; BRUUN, C.S.; BRAUNSCHWEIG, M.H. et al. Genome-wide identification of quantitative trait loci in a cross between Hampshire and Landrace I: carcass traits. **Animal Genetics**, v.37, n.2, p.156–162, 2005.

- KNOTT, S.A.L.; MARKLUND, C.S.; HALEY, K. et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. **Genetics**, v.149, p.1069- 1080, 1998.
- LEE, S.S.; CHEN, Y.; MORAN, C. et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 2. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, n.1, p.11–19, 2003.
- MA, J.; REN, J.; GUO, Y. Genome-wide identification of quantitative trait loci for carcass composition and meat quality in a large-scale White Duroc x Chinese Erhualian resource population. **Animal Genetics**, v.5, p.637-47, 2009.
- MALEK, M.; DEKKERS, J. C. M.; LEE, H. K. et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. **Mammalian Genome**, v.12, p.637–645, 2001.
- MILAN D.; JEON J.T.; LOOFT C. et al. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. **Science**, v.288, p.1248–1251, 2000.
- MILAN, D.; BIDANEL, J. P.; IANNUCELLI, N. et al. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. **Genetics Selection Evolution**, v.34, n.6, p.705-28, 2002.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- MORALES, J.; PEREZ, J.F.; MARTIN-ORUE, S.M. Large bowel fermentation of maize or sorghum-acorn diets fed as a different source of carbohydrates to Landrace and Iberian pigs. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.489–98, 2002.
- NEZER, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B. et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. **Nature Genetics**, v.21, n.2, p.155-6, 1999.
- PAIXÃO, D.M.; SILVA FILHO, M.I.; PEREIRA, M.S. et al. Quantitative trait loci for carcass, internal organ and meat quality traits on porcine chromosomes 16, 17 and 18. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.898-901, 2008a.
- PAIXÃO, D.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; SILVA FILHO, M.I. et al. Detecção de locos de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 and 18 de suínos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.10, p.1781-1787, 2008b
- PEIXOTO, J.O.; FARIA, D.A.; SILVA, P.V. et al. Association between leptin gene single nucleotide polymorphisms and carcass traits in pigs **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.2, p.271-276, 2009.

- PELOSO, J.V. **Qualidade da carcaça e níveis de expressão dos genes FABP3 e FABP4 em suínos destinados à produção industrial de presuntos maturados.** 2006. 104f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- PÉREZ-ENCISO, M.; CLOP, A.; NOGUERA, J. L. et al. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from Iberian by landrace intercross. **Journal Animal Science**, v.78, p.2525-2531, 2000.
- PIRES, A.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F. et al. Quantitative trait loci mapping for meat quality traits in swine chromosome 6. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p608-615, 2005.
- PIRES, A.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F. Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 6, associados às características de carcaça e de órgãos internos de suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1660- 1668, 2006.
- ROHRER, G.A.; THALLMAN, R.M.; SHACKELFORD, S. A genome scan for loci affecting pork quality in a duroc-Landrace F2 population. **Animal Genetics**, v. 37, n.1, p.17-27, 2005.
- SABBIONI, A.; BERETTI, V.; ZANON, A. et al. Effect of the proportion of Duroc genes in crosses with Large White and Landrace pigs on the characteristics of seasoned Parma ham. **Italian Journal of Animal Science**, v. 3, n.1, p. 31-39, 2004.
- SANCHEZ, M.P.; RIQUET, J.; IANNUCELLI, N. et al. Effects of quantitative trait loci on chromosomes 1,2,4, and 7 on growth carcass, and meat quality traits in backcross Meishan x Large White pigs. **Journal Animal Science**, v.84, p.526-537, 2006.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. **SAS/STAT® user's guide**: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.
- SATO, S.; OYAMADA, Y.; ATSUJI, K. et al. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan × Duroc F2 resource population. **Journal Animal Science**, v.81, p.2938–2949, 2003.
- SEATON, G.; HERNANDEZ J., GRUNCHEC J.A. et al. GridQTL: A Grid Portal for QTL Mapping of Compute Intensive Datasets. **Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, August 13-18, 2006. Belo Horizonte, Brazil.

- SERÃO, N., RIBEIRO, A., VERARDO, L., BRACCINI, J.N., GASPARINO, E., CAMPOS, C., LOPES, P., GUIMARÃES, S. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Animal Breeding and Genetics**, JABG-09-0151.R2, 2010. (aprovado).
- SILVA, K.M.; PAIXÃO, D.M.; SILVA, P.V. et al. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p.475-480, 2008.
- SOLLERO, B.P.; PAIVA, S.R.; FARIA, D.A. et al. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v.123, n.1, 2009.
- SONSTEGARD T.S; ROHRER G.A.; SMITH T.P.L. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. **Animal Genetics**, v.29, p.19–22, 1998.
- STRATIL, A.; VAN POUCKE, M.; BARTENSCHLAGER, H.; et al. Porcine OGN and ASPN: mapping, polymorphisms and use for quantitative trait loci identification for growth and carcass traits in a Meishan x Pietrain intercross. **Animal Genetics**, 37, p.415-418, 2006.
- TASHEVA, E.S.; KLOCKE, B.; CONRAD, G.W. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. **Molecular Vision**, v.10, p.758–72, 2004.
- THOMSEN, H.; LEE, H. K.; ROTHSCILD, M. F. et al. Characterization of quantitative trait loci for growth and meat quality in a cross between commercial breeds of swine. **Journal of animal science**, v.82, n.8, p.2213-28, 2004.
- VARONA, L.; OVILO, C.; CLOP, A. et al. QTL mapping for growth and traits in a Iberian by landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. **Genetics Research**, v.80, p.145-154, 2002.
- VIDAL, O.; VARONA, L.; OLIVER, M. A. Malic enzyme 1 genotype is associated with backfat thickness and meat quality traits in pigs. **Animal Genetics**, v.37, p.28–32, 2006.
- WIMMERS, K., MURANI, E.; TE PAS, M.F. et al. Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. **Animal Genetics**, v.38, n.5, p.474-84, 2007.

CAPÍTULO II

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

RESUMO – Objetivou-se com o presente estudo, mapear QTL (Quantitative Trait Loci) associados a características de desempenho nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14, 15 e X de suínos pertencentes a uma população F2 formada a partir do cruzamento entre dois machos da raça naturalizada brasileira Piau e 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Pietrain). O mapa genético de ligação da população foi construído após a genotipagem dos animais para 35 marcadores microssatélites. As estimativas do conteúdo de informação polimórfica (PIC) indicaram que os marcadores microssatélites foram adequados para as análises de QTL. Os dados foram analisados pelo mapeamento por intervalo usando o programa GridQTL. Um total de seis QTL foi encontrado, sendo que o QTL para idade ao abate atingiu o nível de significância genômico de 5% de probabilidade. As informações dos QTL detectados neste estudo serão úteis para a identificação de genes que poderão ser usados em conjunto com os métodos convencionais de seleção; aumento a acurácia destes, além de prover uma melhor compreensão dos fenótipos produtivos de suínos. As informações dos QTL detectados neste estudo serão úteis para estudos de mapeamento fino e a identificação de genes que poderão ser usadas em conjunto com os métodos convencionais de seleção em programas de melhoramento ou mesmo para uma melhor compreensão dos fenótipos de produtivos de suínos.

Palavras-chaves: marcador molecular, nível genômico, raça Piau

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

ABSTRACT - The accomplishment of the present study had as objective to map Quantitative Trait Loci (QTL) related to performance traits in a F2 pig population developed by mating two Brazilian Piau breed sires with 18 dams from a commercial line (Landrace × Large White × Pietrain). The linkage map for this population was constructed after genotyping the animals for 35 microsatellite markers. Estimates of polymorphic information content (PIC) indicated that the microsatellite markers were appropriate for QTL analyses. The genotypes were analyzed by interval mapping using the GridQTL program. A total of 6 QTL were found, from these, the QTL for slaughter age (days) was significant at the 5% genome-wise level. The information of the significant QTL detected in this study is useful for future fine-mapping studies for identification of genes. Such information can be used together with traditional methods in breeding programs or even to a better understanding of the phenotypes of swine production.

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

Introdução

As características de crescimento, consumo e conversão alimentar têm grande importância para a indústria de suínos, uma vez que 70% dos custos de produção dos animais são devido à alimentação; contudo, a arquitetura genética associada a essas características é ainda pouco conhecida.

Selecionar reprodutores para formar um sistema eficiente de produção na suinocultura é um dos objetivos dos programas de melhoramento. Nesse sentido, a identificação de locos e/ou genes que influenciam características economicamente importantes pode resultar em uma maior resposta à seleção e consequentemente em maiores ganhos econômicos na suinocultura.

A varredura genômica é um método que tem demonstrado ser bastante efetivo na localização de regiões envolvidas na expressão de características de interesse econômico nos animais domésticos. Em suínos, um grande número de QTL, ou seja, associações estatísticas significativas entre os valores genotípicos e a variabilidade fenotípica na progênie segregante, têm sido identificados usando intercruzamento entre populações divergentes (Andersson et al. 1994; Knott et al. 1998; De Koning et al., 1999; Pérez-Enciso et al., 2000; Bidanel et al., 2001; Malek et al. 2001; Geldermann et al., 2003; Pires et al., 2005; Silva et al., 2008; Paixão et al., 2008a,b, Duthie et al., 2008; Ding et al., 2009; Gilberts et al., 2010).

A raça naturalizada brasileira Piau cujo nome significa “pintado” na língua indígena de onde é derivada (Tôrres, 1968), foi originada a partir dos primeiros suínos, pertencentes às raças da península ibérica, trazidos pelos colonizadores portugueses. Segundo Guimarães & Lopes (2001), as características principais destes animais são a rusticidade, a adaptabilidade às condições precárias de manejo e alimentação e a grande

resistência a doenças. Além disso, a raça é caracterizada por baixa produção, tamanho pequeno da leitegada e grande acúmulo de gordura subcutânea.

O presente trabalho foi realizado com objetivo de detectar QTL para características de crescimento, conversão alimentar e número de tetas nos cromossomos 1, 2, 3, 12, 14,15 e X de uma população F₂ de suínos formada a partir do cruzamento entre machos da raça Piau e fêmeas pertencentes a uma linhagem comercial e concluir desta forma o mapeamento dos 18 cromossomos autossômicos e do cromossomo sexual X nessa população.

Material e Métodos

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

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

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

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

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

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

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

O DNA dos 20 animais parentais, 64 F1 e 400 F2, foi extraído do sangue coletado imediatamente após o abate, utilizando-se o método de extração por precipitação com sal (Miller et al., 1988). As soluções de DNA para uso foram diluídas na concentração de 25 ng / μ L, em solução de Tris_EDTA (Tris-HCL 10 mM- pH 8,0 e EDTA 1 mM- pH 8,0), e mantidas em geladeira a 4°C. A subsequente análise do DNA genômico foi feita no Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

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

As amplificações de 484 animais foram feitas em termocicladores MJ Research PTC 100-96, utilizando QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen, Valencia, C.A., EUA). O escaneamento dos fragmentos amplificados foi feito utilizando-se o software GenScan

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

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

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

A determinação dos limiares de significância cromossômica ($P_c < 0,05$ e $P_c < 0,01$) foi feita no software GRIQTL, com 10.000 permutações (Churchill & Doerge, 1994). Os limiares genômicos foram obtidos por meio da correção de Bonferroni (Knott et al., 1998). O intervalo de confiança a 95% (IC95%) para a localização do QTL foi obtido usando a aproximação de Qui-quadrado (χ^2). A fração aditiva da variância fenotípica (h^2_q) explicada por determinado QTL foi calculada conforme descrito por Pérez-Enciso et al. (2000).

O seguinte modelo estatístico foi ajustado aos dados:

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

Em que y_{ijkl} é o fenótipo do suíno l do sexo i com genótipo k pertencente ao lote de nascimento j ; S_i é o efeito fixo de sexo i , $i = 1$ (macho castrado), 2 (fêmea); L_j é o efeito fixo de lote j , $j = 1, 2, 3, 4, 5$; H_k é o efeito fixo do genótipo do halotano k , $k = 1$ (NN), 2 (Nn, portador); $(C_{ijkl} - \bar{C})b$ é ajustamento para as covariáveis (TLN, TLD e P77); $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)$ é o resíduo.

Os valores c_a e c_d são as covariáveis associadas aos efeitos aditivos (a) e de dominância (d), sendo tais efeitos uma função das probabilidades condicionais do QTL, dado o genótipo dos marcadores, sendo calculados da seguinte forma:

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

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

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

O genótipo para o gene Halotano foi incluído como efeito fixo, uma vez que Band et al. (2005a,b) observaram não apenas a presença da mutação Hal1843 nesta

população, mas também seus efeitos ($P < 0,05$) sobre características de desempenho, carcaça e qualidade de carne.

A representação gráfica do cromossomo 1, onde se encontrou mais de um QTL, foi feita no programa MAPCHAT (<http://mapchat.ca/>), a partir dos mapas de ligação construídos pelo programa CRIMAP e do banco de dados on line Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nessa representação, os genes candidatos foram selecionados com base em sua função em relação ao desenvolvimento muscular e metabolismo e / ou sua associação com características de importância econômica em suínos (Ensembl, Gene Ontology (GO) - <http://www.geneontology.org> e Literatura pesquisada). Vários desses genes estão atualmente sob investigação.

Resultados e Discussão

Os 35 marcadores utilizados na varredura cromossômica foram classificados como moderadamente polimórficos ($0,25 < PIC < 0,5$) ou altamente polimórficos ($PIC > 0,5$) (Botstein et al., 1980), sendo considerados eficientes para estudos de características quantitativas na população em estudo, uma vez que a aplicabilidade dos marcadores, em varreduras cromossômicas/genômicas, possui relação direta com o seu grau de polimorfismo (Tabela 2).

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

Marcador	Chr ¹	Pos ²	Alelos	PIC	Marcador	Chr ¹	Pos ²	Alelos	PIC
SW781	1	55	3	0,44	SW1962	12	91	4	0,60
SW2035	1	71	4	0,60	S0106	12	113	7	0,81
S0113	1	80	3	0,54	SW857	14	0	7	0,78
SWR982	1	84	3	0,56	SW210	14	45	6	0,56
S0112	1	120	4	0,63	SW761	14	86	4	0,44
SW2423	2	0	6	0,79	SW2515	14	125	5	0,48
SW240	2	48	7	0,70	S0355	15	0	4	0,43
SW395	2	70	5	0,66	S0004	15	29	3	0,39
SW1883	2	98	3	0,35	SW1989	15	64	6	0,69
S0036	2	150	4	0,67	SW1316	15	88	5	0,71
SW2021	3	0	6	0,75	SW936	15	100	5	0,74
S0206	3	39	5	0,59	SW1262	15	130	3	0,51
SW902	3	65	4	0,57	SW949	X	0	6	0,63
S0002	3	112	7	0,79	SW980	X	15	4	0,48
SW717	3	134	4	0,63	SW2126	X	38	3	0,52
SW2494	12	0	3	0,45	SW1943	X	90	3	0,49
SW957	12	24	6	0,64	S0218	X	120	3	0,38
SW168	12	61	4	0,68					

¹ SSC –*sus scrofa chromosome*

² Posição dos marcadores no cromossomo em cM.

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

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

Foram identificados seis QTL associados a diferentes características de desempenho; sendo o QTL para idade ao abate no SSC3 significativo em nível genômico (Tabela 3).

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

SSC	¹ Características	F	² POS	a (DP)	d (DP)	³ h_q^2 (%)	⁴ IC
1	CR	6,21*	102	1,89 (0,94)	-7,48(2,35)	3,70	95-120
1	GPD	5,57*	93	0,04 (0,01)	-0,07 (0,03)	6,40	85-100
1	IDA	5,08*	68	-0,39(0,89)	4,62(1,44)	0,08	60-75
3	IDA	8,3***	10	3,74(1,00)	-193(2,04)	7,32	0-26
15	CR	5,45*	64	-0,30(0,54)	2,52(0,77)	0,10	50-73
X	NT	7,28*	77	0,32(0,15)	0,80(0,31)	3,24	68-98

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

A deposição de gordura requer mais energia e nutrientes do que a deposição de proteína, assim, alelos associados a um maior consumo de alimentos podem estar diretamente relacionadas a uma maior deposição de gordura. No presente estudo, encontrou-se QTL para CR ($a=1,89$; $P_c < 0,05$) e GPD ($a=0,04$; $P_c < 0,05$) na região distal do SSC1, cujo os alelos da raça Piau, raça caracterizada por grande acúmulo de gordura subcutânea, estariam envolvidos com o aumento dessas características (Figura 1). Ainda no SSC1 encontrou-se um QTL para IDA associado aos alelos vindos da linhagem comercial ($a=-0,39$), o que não era esperado uma vez que os animais de linhagem comercial, tipo carne, atingem o peso de abate antes dos animais Piau, tipo banha, contudo, tal QTL explicou muito pouco da variação fenotípica dessa característica ($h_q^2=0,08\%$).

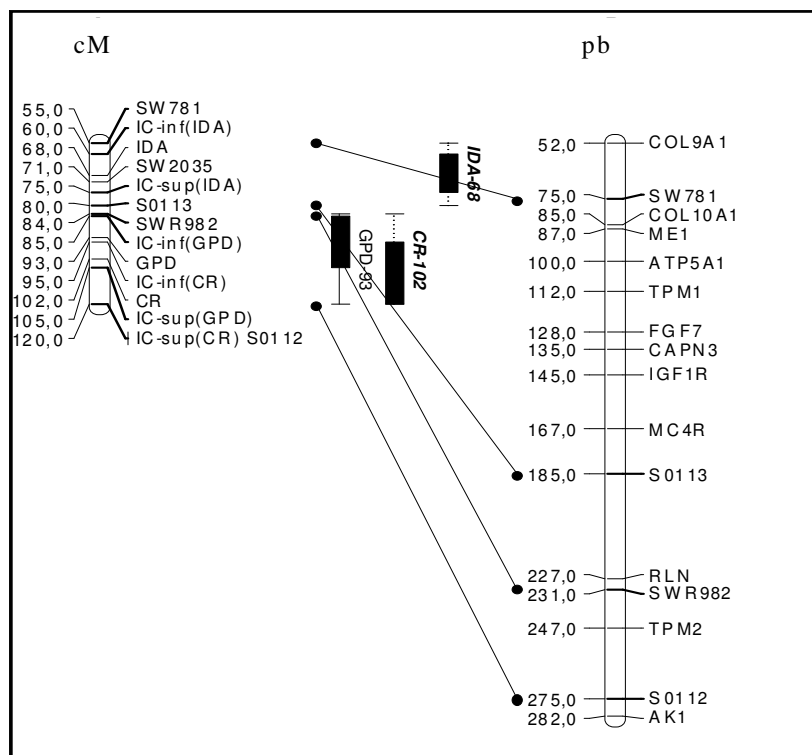


Figura 1 – Representação gráfica dos QTL IDA- Idade ao abate, CR- Consumo alimentar e GPD- ganho de peso diário (barra vertical escura) encontrados no SSC1, seus intervalos de confiança (linha vertical pontilhada) e os marcadores que os delimitam em centiMorgan - cM que são interligados com suas respectivas posições no mapa em pares de base – PB (linhas perpendiculares). Genes candidatos a influenciar características de importância econômica em suínos, também estão representados: COL9A1 (colágeno, tipo IX, alfa 1), COL10A1 (colágeno, tipo X, alfa 1), ME1 (enzima málica 1), ATP5A1 (ATP sintase, H + transporte, complexo mitocondrial F1, subunidade alfa-1), TPM1 (tropomiosina 1), FGF7 (fibroblasto fator de crescimento 7), CAPN3 (calpaina 3), IGF1R (receptor de crescimento semelhante a insulina), MC4R (receptor de melanocortina4), RLN (precursor de prorelaxina), TPM2 (tropomiosina 2) e AK1 (adenilato quiinase 1).

O melhoramento genético baseia-se na variabilidade existente entre os animais. Segundo Cheng et al. (2000), estudos sobre polimorfismos de nucleotídeos (SNP) têm grande potencial para melhorar as características de desempenho como massa muscular, conversão alimentar e ganho de peso diário. No presente trabalho, na região próxima aos QTL associados a CR e GPD no SSC1 (Figura 1), encontra-se o Receptor 4 da Melanocortina (MC4R), sendo este um gene candidato à regulação do balanço energético em suínos. De acordo com os resultados de Kim et al. (2000), o MC4R exerce

influência nas características de desempenho em suínos, particularmente na taxa de crescimento e no consumo alimentar. Já, Paszek et al. (1999), encontraram QTL para GDP na região do gene IGF1R em Meishan × Yorkshire.

Os QTL para CR e GPD, localizados na posição distal do SSC1, entre os marcadores SWR942 e S0112, explicaram, respectivamente, 3,7 e 6,4 % da variância fenotípica da característica. Assim como no presente trabalho, Sanchez et al. (2006) encontraram QTL para GPD na posição distal do SSC1, ao estudar uma população Meishan X Large White. Beeckmann et al. (2003) encontraram QTL para CR a 117,2 cM e 74,3 cM e para GPD a 59,7 cM, no SSC1 de suínos selvagem europeu X Pietrain, sendo que tais QTL explicaram, respectivamente, 6,1 %, 4,3% e 6,4 % da variância fenotípica. Liu et al. (2007) encontraram QTL para GPD, entre os marcadores SW1824 e SW1301, a 88,9 cM no SSC1, segregando em uma população Duroc X Pietrain. .

A variação na localização do QTL para a mesma característica ou a ausência do QTL em diferentes populações, se deve ao fato de que os estudos de mapeamento são feitos em populações com distintas composições genéticas e/ou diferentes marcadores. Assim, o alelo associado a um determinado QTL pode não estar em desequilíbrio de ligação com os marcadores avaliados nos diferentes estudos. Dessa forma, é necessário proceder a validação dos QTL detectados em populações experimentais, antes de tais informações serem utilizadas em programas de seleção.

Na região proximal do SSC3 (10 cM) encontrou-se QTL significativo em nível genômico de 5% de probabilidade para IDA, sendo que tal QTL explica 7,32% da variação fenotípica da característica (Figura 2) e está associado aos alelos da raça Piau. Tal resultado era esperado, pois o ganho de peso de animais tipo banha, como é o caso da raça Piau, é mais lento. Segundo Benevenuto Júnior (2001), ao estudar a presente

população, os suínos Piau atingiram peso ao abate após 7 meses de idade, enquanto os suínos da linhagem comercial atingiram o peso ao abate entre 4 e 5 meses.

Contrastando com o resultado encontrado no atual estudo, vários autores encontraram QTL para peso ao nascimento no SSC3: Liu et al (2007) encontrou QTL para peso ao nascimento na região proximal do SSC3 (entre os marcadores SW72 e S0164, a 0 cM, segregando em uma população Duroc X Pietrain; Quintanilla et al. (2002) detectaram QTL para a referida característica a 23 cM e 29 cM, a partir de uma população Meishan x Large White; Malek et al. (2001), a partir de uma população Berkshire x Yorkshire, detectaram QTL a 19 cM no SSC3.

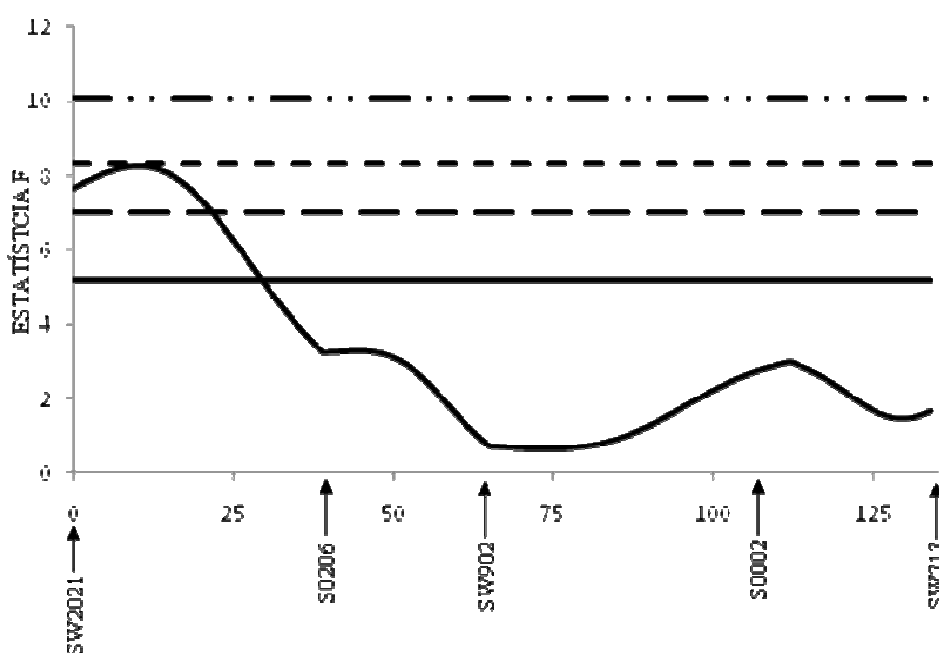


Figura 2 - Estimativas dos valores de F para idade ao abate (IDA) no SSC 3. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (---), 5% em nível genômico (-.-) e 1% em nível genômico (-.-.-). A posição dos marcadores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

Na região central do SSC15 (64 cM), entre os marcadores SW1989 e SW1119, encontrou-se um QTL ao nível genômico de 5% de probabilidade para CR. Tal QTL está associado aos alelos da linhagem comercial e explica apenas 0,10% da variação

fenotípica. Resultado semelhante foi encontrado por Liu et al. (2007), que detectaram um QTL para consumo de ração no SSC15 (IC = 88,5 - 119,9), segregando em uma população Duroc X Pietrain, entre os marcadores SW936-SW1119, explicando 1,97% da variação fenotípica. Houston et al. (2005) encontraram QTL para consumo de ração dos 35 aos 55 Kg a 94,4 cM e QTL para CR dos 35 aos 80 Kg a 83,1 cM, segregando em uma população Meishan X Large White.

Identificou-se QTL para NT, a 5% ao nível cromossômico, no cromossomo sexual X (Figura 3). Tal QTL explica 3,24% da variação fenotípica da característica e está associado aos alelos da raça Piau. O número total de tetas é uma característica importante, pois influencia o desempenho dos leitões durante a fase de pré-desmama.

Faria et al. (2006) encontraram, na presente população, associação significativa entre número de tetas e um polimorfismo detectado no gene do hormônio do crescimento (G316A), sendo tal gene localizado no SSC12. Vários estudos, empregando distintas populações, relatam a presença de QTL para número de tetas em diferentes cromossomos: Ding et al. (2009) detectaram, a partir de uma população Duroc × Erhualian, QTL para número de tetas nos cromossomos suínos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 12; Sato et al. (2006), a partir de uma população Meishan x Duroc, detectaram QTL para a referida característica, no SSC7 e Beeckmann et al. (2003) detectaram QTL no SSC8 segregando em uma população de porco selvagem × Meishan.

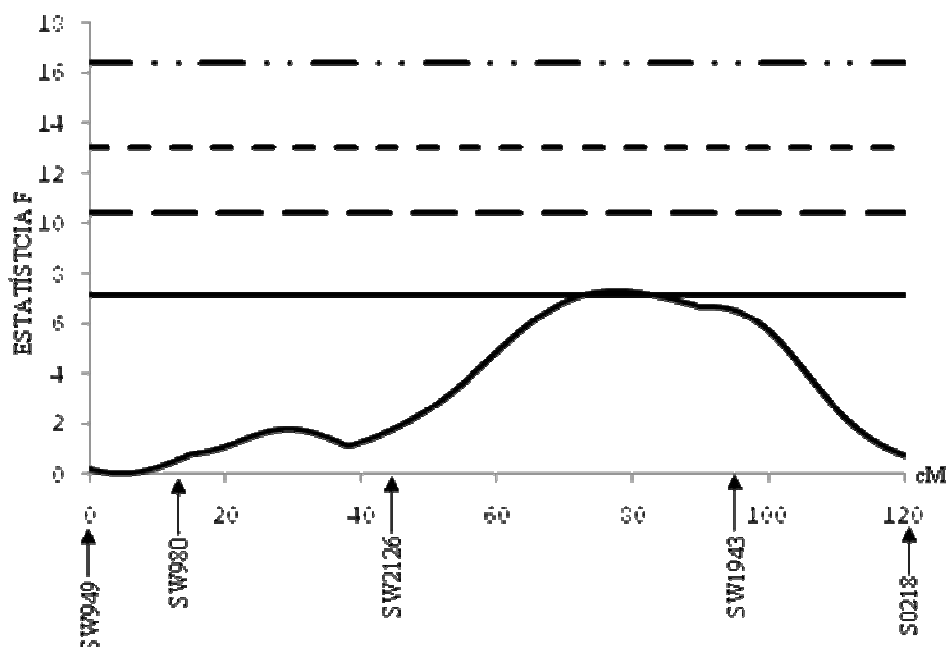


Figura 3 - Estimativas dos valores de F para número de tetas (NT) no SSC X. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo: 5% em nível cromossômico (—), 1% em nível cromossômico (---), 5% em nível genômico (-.-) e 1% em nível genômico (-.-.-). A posição dos marcadores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

Conclusão

Foram detectados QTL significativos para características de desempenho nos cromossomos 1, 3, 15 e X de suínos pertencentes a uma população derivada do cruzamento entre a raça Piau e uma linhagem comercial. O mapeamento fino dessas regiões será necessário para o melhor entendimento do efeito de cada QTL e a possível detecção de genes candidatos.

Agradecimentos

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

Literatura Citada

- ANDERSSON L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H. et al. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.263, p.1771-1774, 1994.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.8, n.1, p.88-91, 2005a.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress Syndrome gene and carcass and performance trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.8, n.1, p.92-96, 2005b.
- BEECKMANN, P.; SCHRÖFFEL, J.R., J., MOSER, G. et al. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 1. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, n.1, p.1-10, 2003.
- BENEVENUTO JÚNIOR, A. A. **Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- BIDANEL, J. P.; MILAN, D.; IANNUCELLI, N. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Genetics Selection Evolution**, v.33, p.289-309, 2001.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- CHENG, T.K.W.; LEE, C.H.; HUNG, C.M. et al. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan Pigs. **Theriogenology**, v.54, n.8, p.1225, 2000.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.
- DE KONING, D.J.; JANSSE, L.L.G.; RATTINK, A. P. et al. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (Sus scrofa). **Genetics**, v.152, p.1679-1690, 1999.
- DING, N.; GUO, Y.; KNORR, C. et al. Genome-wide QTL mapping for three traits related to teat number in a White Duroc x Erhualian pig resource population. **BMC Genetics**, v.10, n.6, 2009
- DUTHIE, C.; SIMM, G.; DOESCHL-WILSON, A. et al. Quantitative trait loci for chemical body composition traits in pigs and their positional associations with body tissues, growth and feed intake. **Animal Genetics**, v.39, p130-140, 2008.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.634-640, 2006.
- GELDERMANN, H.; MÜLLER, E.; MOSER, G. et al. Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.120, p.363-393, 2003.
- GILBERT, H.; RIQUET, J.; GRUAND, J. et al. Detecting QTL for feed intake traits and other performance traits in growing pigs in a Piétrain-Large White backcross. **Animal**, v.4, p.1308-1318, 2010.
- GREEN. P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **Documentation for CRIMAP**. St. Louis: Washington University School of Medicine, 1990.

- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, v.15, n.3, p.27-28, 2001.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S. A.; ELSSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.136, p.1195–1207, 1994.
- HOUSTON, R.D.; HALEY, C.S.; ARCHIBALD, A.L. et al. A QTL affecting daily feed intake maps to Chromosome 2 in pigs. **Mammalian Genome**, v.16, p.464–470, 2005
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1006, 2007.
- KIM, K.S.; LARSEN, N.; SHORT, T. et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. **Mammalian Genome**, v.11, p.131–135, 2000.
- KNOTT, S.A.L.; MARKLUND, C.S.; HALEY, K. et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. **Genetics**, v.149, p.1069- 1080, 1998.
- LIU, G.; JENNEN, D.G.J.; THOLEN, E. et al. A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. **Animal Genetics**, v.38, p.241–252, 2007.
- LOBJOIS, V.; LIAUBET, L.; SANCRISTOBAL, M. A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. **Animal Genetics**, v.39, p.147-162, 2008.
- MALEK, M.; DEKKERS, J. C. M.; LEE, H. K. et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. **Mammalian Genome**, v.12, p.637–645, 2001.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- PAIXÃO, D. M., SILVA FILHO, M. I., PEREIRA, M. S. et al. Quantitative trait loci for carcass, internal organ and meat quality traits on porcine chromosomes 16, 17 and 18. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.898-901, 2008a.
- PAIXÃO, D.M., GUIMARÃES, S.E.F., SILVA FILHO, M.I. et al. Detecção de locos de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 and 18 de suínos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.10, p.1781-1787, 2008b.
- PASZEK, A.A.; WILKIE, P.J.; FLICKINGER, G.H. et al. Interval mapping of growth in divergent swine cross. **Mammalian Genome**, v.10, p.117–122, 1999.
- PÉREZ-ENCISO, M.; CLOP, A.; NOGUERA, J. L. et al. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from Iberian by landrace intercross. **Journal Animal Science**, v.78, p.2525-2531, 2000.
- PIRES, A.V.; LOPES, P.S., GUIMARÃES, S.E.F. et al. Quantitative trait loci mapping for meat quality traits in swine chromosome 6. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5; p608-615, 2005.
- QUINTANILLA, R.; MILAN, D.; BIDANEL, J. P. A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in a cross between Meishan and Large White pig populations. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.193–210, 2002.
- SANCHEZ, M.P.; RIQUET, J.; IANNUCELLI, N. et al. Effects of quantitative trait loci on chromosomes 1, 2, 4, and 7 on growth, carcass, and meat quality traits in backcross Meishan - Large White pigs. **Journal of Animal Science**, v.84, p.526–37, 2006.

- SAS INSTITUTE INCORPORATION. **SAS/STAT® user's guide**: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.
- SATO, S.; ATSUI, K.; SAITO, N. et al. Identification of quantitative trait loci affecting corpora lutea and number of teats in a Meishan × Duroc F2 resource population. **Journal Animal Science**, v.84, n.11, p. 2895-2901, 2006.
- SEATON, G.; HERNANDEZ J.; GRUNCHEC J.A. et al. GridQTL: a Grid Portal for QTL mapping of compute intensive datasets. In: 8TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION. **Anais...** Belo Horizonte, Brazil, 2006. p.13-18.
- SILVA, K.M.; PAIXÃO, D.M.; SILVA, P.V. et al. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p.475-480, 2008.
- TÔRRES, A.D.P. **Suínos: Manual do criador. Biblioteca Agronômica Melhoramentos**. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1968. 428p.

CAPÍTULO III

Avaliação da expressão de genes selecionados *in silico* em regiões sob QTL associados a características de interesse econômico em suínos

RESUMO - A realização do presente estudo teve como objetivo investigar e comparar o nível de expressão dos genes: CAPN3 (calpaina 3), COL9A1 (colágeno, tipo IX, $\alpha 1$), COL10 (colágeno, tipo X, $\alpha 1$), EPOR (receptor eritropoetina), IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2), MyoD1 (diferenciação miogênica), Myo6 (miosina VI) e TNC (Tenascina C) mapeados *in silico* sob QTL de importância econômica em suínos mapeados *in silico* sob QTL de importância econômica em suínos. Foram utilizados 36 machos castrados de três grupos genéticos, raça naturalizada brasileira Piau, linha comercial e cruzados. A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 10, 100, 200 e 400 ng e nas concentrações de primer de 100, 200 e 400 ng por reação. Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando o modelo misto e o efeito da gordura intramuscular (GIM) foi usado como covariável. Observou-se variação no nível de expressão dos genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, MYOD1 e IGF2 e dada à evidência experimental que associa estes genes com características de grande importância econômica na produção de suínos, maiores estudos devem ser realizados com esses genes, a fim de seqüência-los, pesquisar e validar mutações causais associadas com essas características.

Palavra chave: Piau, RT-qPCR, mRNA, Sus scrofa

Evaluation of the expression of genes selected in silico on regions of QTL related to characteristics of economic interest in pigs

ABSTRACT - The accomplishment of the present study had as objective evaluate the level of expression of genes: CAPN3 (calpain 3), COL9A1 (collagen, type ix, alpha 1), COL10A1 (collagen, type x, alpha 1), EPOR (erythropoietin receptor), IGF2 (insulin-like growth factor), MYOD1 (myogenic differentiation 1), MYO6 (miosin vi) e TNC (tenascinc) mapped in silico to qtl of economic importance in pigs. Thirtysix pigs of three genetic groups (brazilian piau breed, commercial line and crossbred) were used. The amplification efficiency of each gene was calculated through the construction of curve of dilution in series of cdna in the concentrations of 10, 100, 200 and 400 ng and in the concentration of primer of 100, 200 and 400 ng by reaction. Data from rt-qpcr were analyzed using mixed model and the effect of intramuscular fat content (IMF) was used as covariate. it was observed variation on the level of expression of the genes CAPN3, COLL12A1, COL15A1, EPOR, MYOD1 and IGF2 and given the experimental evidence linking these genes with characteristics of great economic importance in swine production, therefore, larger studies must be performed with such genes in order to sequence for causal mutation search and validate causal mutations associated with these characteristics.

keywords: Piau, RT-qPCR, mRNA, Sus scrofa

Introdução

Várias características economicamente importantes na produção de suínos são expressas pela ação de muitos genes; influenciados pelo meio ambiente e suas interações; e a identificação da região no genoma onde se encontram esses genes, pode ser feita por meio da detecção de QTL (*Quantitative Traits Loci*).

Cinco mil novecentos e oitenta e seis QTL associados a diferentes características de interesse econômico em suínos foram mapeados em diferentes intercrossamentos em suínos (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb>; USDA, 04/12/2010). Contudo, pouco desses QTL foram reduzidos a genes; uma vez que há grande variabilidade nas estimativas dos seus efeitos e o fato dos QTL se localizarem em intervalos amplos, em torno de 20 a 30 cM.

Liu et al. (2007), encontraram QTL para pH e cor da carne na região do gene MC4R (receptor 4 de melancortina) no cromossomo 1 (SSC1). Segundo, Jennen et al. (2007), os genes AK1 (adenilato quinase 1), ATP5A1 (ATP sintase, H + transporte, complexo F1 mitocondrial, subunidade alfa-1), CAPN3 (calpaina 3), IGF1R (receptor do fator de crescimento semelhante a insulina), TPM1 (tropomiosina 1), TPM2 (tropomiosina 2), CAST (calpastatina), CKMT2 (creatina quinase, mitocondrial 2), IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina 2), LDHA (lactato desidrogenase A), MyoD1 (diferenciação miogênica 1), PYGM (fosforilase, glicogênio, muscular), TTID (miotilina) diferencialmente expressos e mapeados sob QTL para características de qualidade de carne nos SSC1 e SSC2 seriam potenciais genes candidatos a influenciar essas características em suínos. Vidal et al. (2006) encontraram associação do gene ME1 (enzima málica 1) com espessura de toucinho e pH muscular em suínos no SSC1. Lee et al. (2003), encontraram QTL para características de carcaça associado ao marcador microssatélite SW240 e gene MYOD (IC=42-57,4 cM) no SSC2. Serão et al. (2010) encontraram correlação dos genes LDLR (receptor de lipoproteína de baixa densidade) localizado no SSC2 e do TRDN (triadina) localizado no SSC1 com gordura intramuscular utilizando os mesmos grupos genéticos do presente trabalho. Sollero (2010) observaram expressão diferenciada do gene tenascina (TNC) mapeada no SSC1 entre animais Piau e cruzados Yorkshire x Landrace em fetos com 40 dias de gestação em relação a fetos de 70 dias de gestação, sugerindo um papel importante para TNC durante a formação das fibras musculares primárias.

Recentemente, com o mapeamento completo do genoma de suínos e de várias outras espécies, a busca *in silico* por genes posicionados em regiões sob QTL, utilizando sistema automatizado de fornecimento de anotação e classificação de genoma como o projeto Ensembl (http://www.ensembl.org/Sus_scrofa) e Gene Ontology (GO) database (<http://www.geneontology.org>) torna-se uma realidade. Esta metodologia, encontra no PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) um método eficiente para a quantificação dos níveis de transcritos de mRNA desses genes posicionais, podendo assim, avaliar a influência desses, nos QTL associados as características quantitativas de impotência econômica em suínos.

Objetivou-se com este estudo realizar a comparação do nível de expressão dos genes CAPN3 (calpaina 3), COL9A1 (colágeno, tipo IX, $\alpha 1$), COL10 (colágeno, tipo X, $\alpha 1$), EPOR (receptor eritropoetina), IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2), MyoD1 (diferenciação miogênica), Myo6 (miosina VI) e TNC (Tenascina C) em suíno Piau, comercial e cruzados, localizados sob QTL no SSC1 e SSC2, com o intuito de selecionar os mais promissores para posterior análise e associação com fenótipos de importância econômica em suínos.

Material e Métodos

Animais, coleta e extração do mRNA

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

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

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

Análise in silico

A seleção dos genes para realização do RT-qPCR foi feita *in silico*, baseada na função e classificação dos genes em relação ao desenvolvimento muscular e metabolismo e a associação com características de importância econômica em suínos (Ensembl (http://www.ensembl.org/Sus_scrofa), Gene Ontology (GO)-<http://www.geneontology.org> e literatura pesquisada), juntamente com sua localização sob ou próximos a QTL associados a características de qualidade de carne e desempenho no SSC1 (Figura 1) e características de corte de carcaça e qualidade de carne no SSC2 (Figura 2); mapeados previamente em uma população F2 formada a partir do cruzamento de machos Piau e fêmeas da linha comercial (Landrace X Large White X Pietrain). As figuras 1 e 2 são a representação gráfica dos cromossomos 1 e 2 respectivamente, feitas no programa MAPCHAT (<http://mapchat.ca/>) a partir dos mapas de ligação construídos pelo programa CRIMAP em cM para população F2 e os genes mapeados *in silico* com a localização em pares de base (pb) (http://www.ensembl.org/Sus_scrofa). Maiores detalhes sobre a população F2 foram descritos por Band et al. (2005), Faria et al. (2006), Paixão et al. (2008 a, b), Silva et al. (2008).

No presente estudo, a comparação do nível de expressão foi feita nos genes calpaina 3 (CAPN3), colágeno tipo IX alfa 1 (COL9A), colágeno tipo XII alfa 1 (COL10A1), receptor eritropoetina (EPOR), fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2 (IGF2), diferenciação miogênica (MYOD1), miosina VI (MYO6) e Tenascina C (TNC), uma vez que os demais genes apresentados nas Figuras 1 e 2, já

foram estudados (Serão et al., 2010; Sollero, 2010) ou estão atualmente sob investigação no LABTEC.

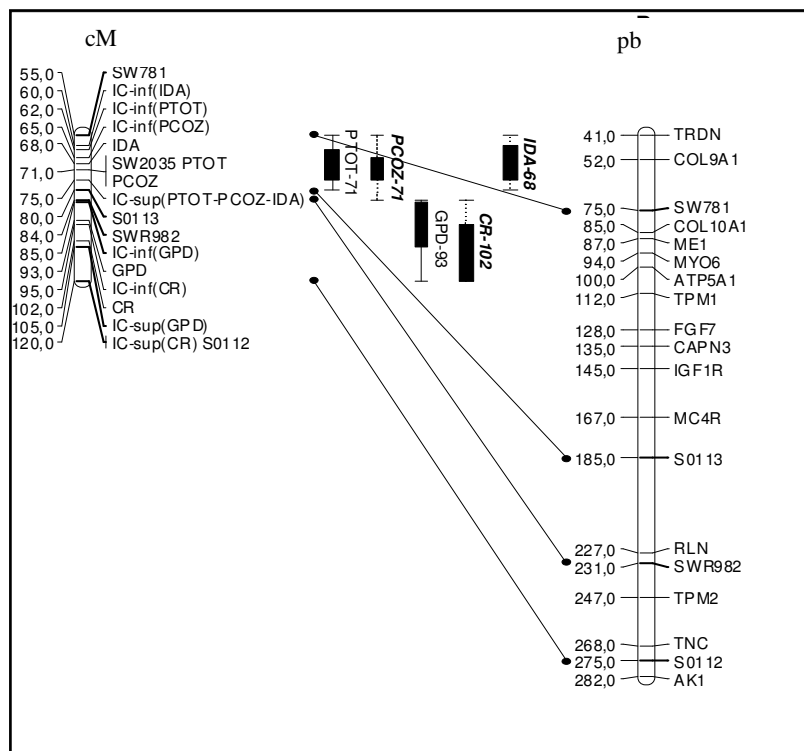


Figura 1 – Representação gráfica dos QTL (barra vertical escura) para PTOT (perda total de peso na carne), PCOZ (perda de peso por cozimento), IDA (idade ao abate), CR (consumo de ração), GPD (ganho de peso diário) mapeados no SSC1; seus intervalos de confiança (linha vertical pontilhada) e os marcadores que os delimitam em centiMorgan - cM que são interligados com suas respectivas posições no mapa em pares de base - pb (linhas perpendiculares). Genes candidatos a influenciar características de importância econômica em suínos, também estão representados: COL9A1 (colágeno, tipo IX, alfa 1), COL10A1 (colágeno, tipo X, alfa 1), ME1 (enzima málica 1), ATP5A1 (ATP sintase, transportador de H⁺, complexo mitocondrial F1, subunidade alfa 1, músculo cardíaco), TPM1 (tropomiosina 1), FGF7 (fibroblasto fator de crescimento 7), CAPN3 (calpaína 3), IGF1R (receptor de crescimento semelhante a insulina), MC4R (receptor de melanocortina 4), RLN (precursor de prorelaxina), TPM2 (tropomiosina beta 2) e AK1 (adenilatoquinase 1).

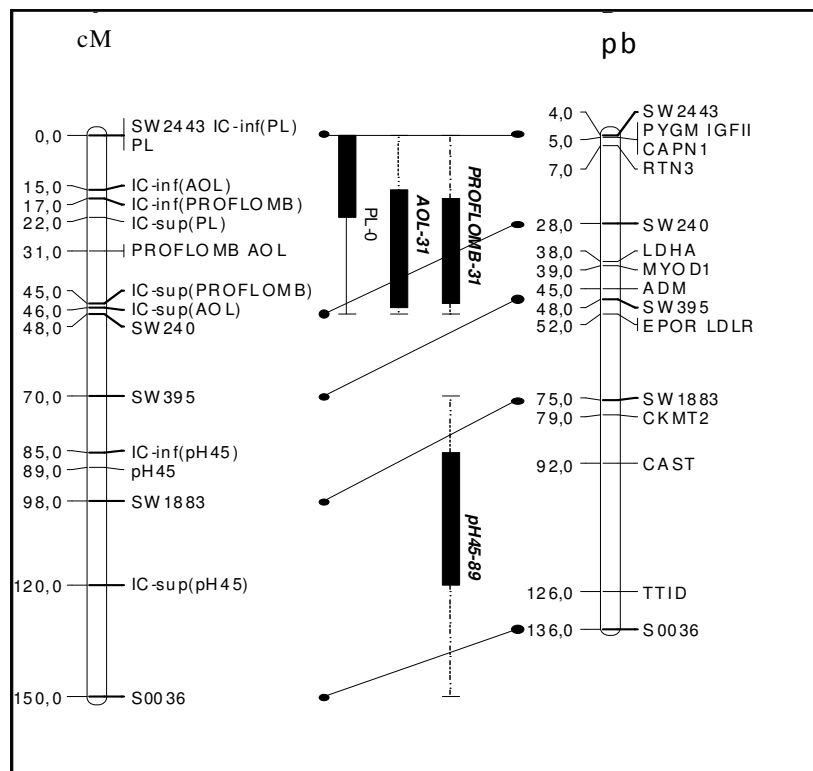


Figura 2 – Representação gráfica dos QTL (barra vertical escura) para PL (peso de lombo), AOL (área de olho de lombo), PROFLOMB (profundidade de olho de lombo) e pH 45 (pH45 minutos *post mortem*) mapeados no SSC2; seus intervalos de confiança (linha vertical pontilhada) e os marcadores que os delimitam em centiMorgan - cM que são interligados com suas respectivas posições (linhas perpendiculares) no mapa em pares de base - pb. Genes candidatos a influenciar características de importância econômica em suínos, também estão representados: PYGM (fosforila e glicogênio muscular), IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina 2), CAPN1 (calpaína 1), RTN3 (reticulona 3), LDHA (lactato desidrogenase A) MYOD1 (diferenciação miogênica 1), ADM (adrenomedulina), EPOR (receptor de eritropoietina), LDLR (receptor de lipoproteína de baixa densidade), CKMT2 (creatina quinase mitocondrial 2), CAST (calpastatina) e TTID (miotilina).

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/primerQuest>) fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os *primers* utilizados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Sequência de nucleotídeos dos *primers* (5'- 3') para *Sus scrofa*, número de acesso no GeneBank

GENES ¹	SEQUENCIA DE NUCLEOTÍDEOS ²	ACESSO
ACTB	F: CAACTTTGCAACAGCGGAC R: GAGTGTTCCTCGGGCTTTAG	AY550071
CAPN3	F: AGTACGTCATTGTGCCCTCCACTT R: TGGCCGATCCACGGAGATTGTATT	NM_214171
COL9A1	F:AGCCAGTGGAGAAGAAACCTGGAA R: TTCTTCCCACACTCCAAGAGCCAT	NM_001927036.2
COL10A1	F:ACTGTTGTCCACCTACCGAGCATT R: AGTACTTGGCCCTTGAGGTTCACT	NM_001009193.1
EPOR	F: ACCCTTATGAGAACAGCCTTG R: CTGGATAAATGTTGGGCTTGG	NM_214292.1
IGF2	F: TCCCCATGTCAGGCTAGTC R: GGAGATACAGACCAAGCCAAT	NM_213883.2
MYOD1	F: CAACTTTGCAACAGCGGAC R: GAGTGTTCCTCGGGCTTTAG	NM_001002824.1
MYO 6	F:AAGGAGGAGGAATCCCAACAGCAA R: ATCACTGATGAGCTCGGCTTCACT	NM_214021.1
TNC	F:TGAGGGGCCAGTTTGACACCTTCAT R: GCCATACCGCTTCTTGTTTCGCAAT	NM_214230.1

¹ACTB-β-actina, CAPN3-calpaina 3, COL12A1-colágeno tipo XII α 1, COL15A1-colágeno tipo XV α1, EPOR- receptor eritropoetina, IGF2- fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2, MyoD1-diferenciação miogênica, Myo 6 – miosina VI e TNC – Tenascina C²F=Forward e R:Reverse

Teste de eficiência e RT-qPCR

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 10, 100, 200 e 400 ng e de primer de 100, 200 e 400 ng por reação. A partir dos dados obtidos, um gráfico de Ct (*threshold cycle*) versus o log₁₀ da quantidade de cDNA utilizada na reação foi construído e a regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta para determinar a eficiência de amplificação seguiu a equação desenvolvida por Pfaffl (2001):

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

As reações de RT-qPCR foram efetuadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, EUA) e as condições de

amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; e extensão a 60°C durante 60 segundos. Nos testes de eficiência ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual de temperatura de 60°C a 95°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação.

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

Análise Estatística

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

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

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

Em que: y_{ijkl} é o nível de expressão mensurado no gene k no animal l da raça j no peso i; PRG_{ijk} é o efeito da interação entre o peso i, raça j e gene k; $A_{(ij)l}$ é o efeito aleatório do animal l dentro da interação entre o peso i e a raça j, $A_{(ij)l} \sim N(0, \sigma^2_A)$; D_{ijk} é o efeito aleatório amostra-específico (comum aos dois genes), $D_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_D)$; G_{ijl} é o conteúdo de gordura intramuscular do animal l da raça j no peso i, sendo $\bar{G}$ o conteúdo de gordura intramuscular médio e b_1 e b_2 , respectivamente, os coeficientes de regressão linear e quadrático; e_{ijkl} é o termo de erro aleatório, $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2_e)$. A significância das estimativas dos contrastes, grupo genético versus peso de abate foi avaliada mediante o teste t de *Student*.

As análises estatísticas foram realizada utilizando a macro QPCR_MIXED desenvolvido em SAS (v. 9.2), elaborada para gerar comandos do SAS PROC MIXED

próprios para analisar dados de RT-qPCR, assumindo efeitos aleatórios independentes para gene referência e genes alvos (Steibel et al., 2009) .

Resultados

Com exceção dos genes: TNC que não amplificou e o MYO6 que apresentou eficiência negativa para todas as concentrações de primer e cDNA testadas, nas demais reações, a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene referência foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno, tal como descrito por Livak & Schmittgen (2001). As concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cDNA utilizados nas reações de amplificação são apresentadas na tabela 3.

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

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

[†] ACTB- β -actina, CAPN3-calpaina 3, COL9A1-colágeno tipo IX α 1, COL10A1-colágeno tipo X α 1, EPOR- receptor eritropoetina, IGF2- fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2, MyoD1- diferenciação miogênica.

Foi observada entre os grupos genéticos variação no nível de expressão dos genes CAPN3, COL12A1 e COL15A1 selecionados sob ou próximos aos QTL previamente descrito para PTOT (perda total de peso na carne), PCOZ (perda de peso por cozimento), IDA (idade ao abate), CR (conversão alimentar) e GPD (ganho de peso diário) no SSC1, e para os genes EPOR, MYOD1 e IGF2 selecionados sob ou próximos aos QTL para PL (peso de lombo), AOL (área de olho de lombo), PROFLOMB (profundidade de olho de lombo) e pH 45 (pH45 minutos post mortem) no SSC2.

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

CAPN3 foi 4,69 ($P<0,001$) vezes maior nestes animais do que nos animais cruzados (Figura 3).

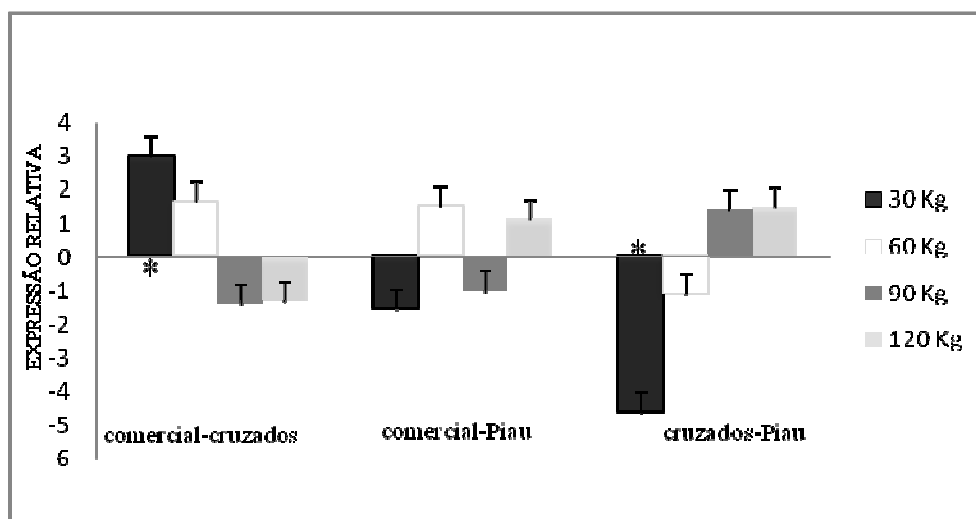


Figura 3- Comparação da expressão relativa do gene CAPN3 (calpaína 3) entre os grupos genéticos comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O * indica o grupo que apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

No presente trabalho, o gene colágeno tipo IX α -1 (COL9A1) foi 5,07 ($P<0,01$), 3,41 ($P<0,05$) e 5,43 ($P<0,01$) vezes mais expresso nos animais Piau do que nos animais comerciais nos pesos de abate 30, 60 e 90 Kg, respectivamente. Sendo também mais expresso em Piau, no contraste cruzados-Piau, com valores de 5,97 ($P<0,01$) e 7,22 ($P<0,01$) vezes nos pesos 30, 90 Kg, respectivamente. Já no peso de abate de 120 Kg observou-se a maior expressão do COL9A1 nos animais cruzados do que em animais Piau 4,77 ($P<0,01$) vezes (Figura 4).

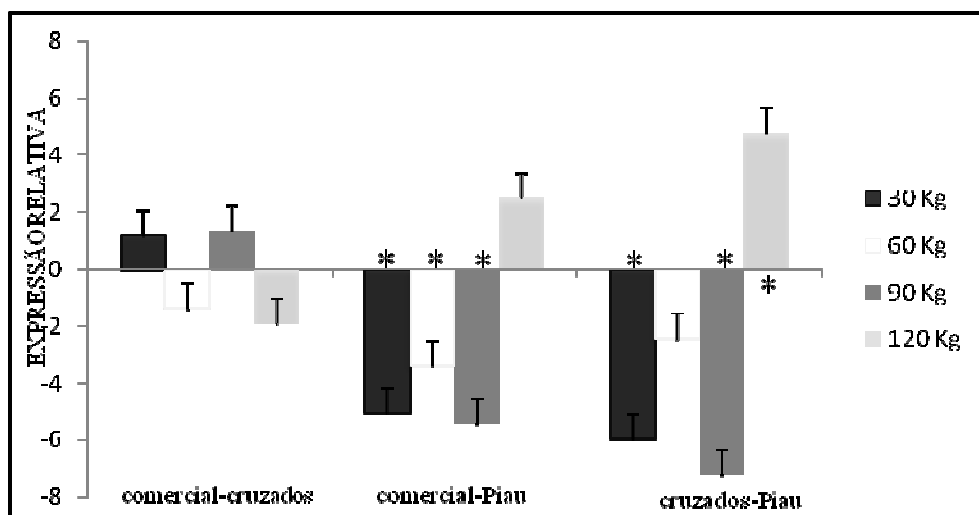


Figura 4- Comparação da expressão relativa do gene COL9A1 (colágeno tipo IX α -1) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O * indica o grupo que apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

A expressão do COL10A1 (colágeno tipo X α -1) que foi maior nos animais cruzados do que nos animais comerciais (7,88 vezes no peso de abate de 30Kg e 6 vezes no peso de abate de 60 Kg) (Figura 5). Nos animais Piau a expressão foi 7,88 vezes ($P<0,01$) e 5,79 ($P<0,05$) vezes maior do que nos animais comerciais nos pesos de abate de 30Kg e 90 Kg, respectivamente.

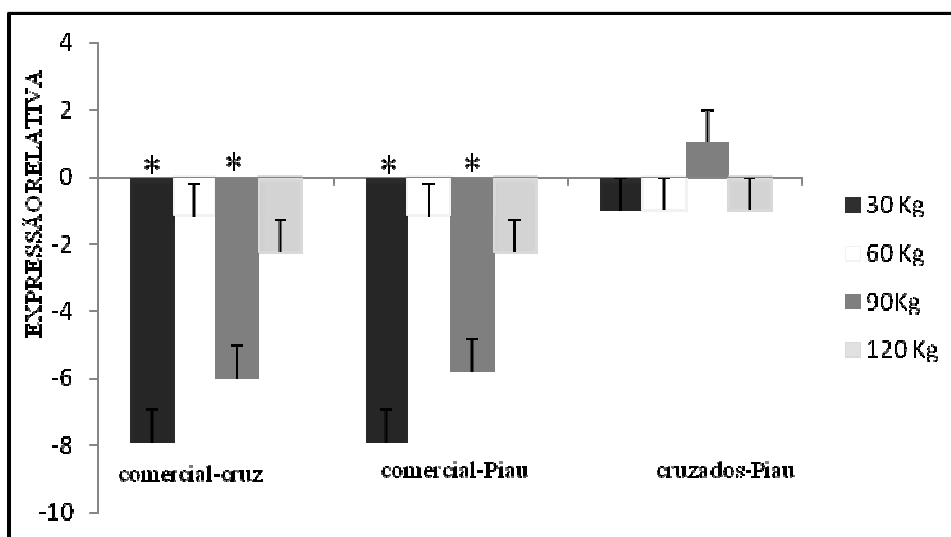


Figura 5- Comparação da expressão relativa do gene COL10A1 (colágeno tipo X α -1) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30,60, 90 e 120 Kg). O * indica o grupo que apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

A expressão do gene receptor eritropoetina (EPOR) foi três vezes ($P<0,01$) maior nos animais cruzados do que em animais comerciais no peso de abate de 120 Kg. Foi 3,92 ($P<0,01$) e 5,89 ($P<0,001$) vezes mais expresso em cruzados do que em animais Piau nos pesos de abate de 60 e 120 Kg, respectivamente. E nos animais comerciais expressaram 2,79 ($P<0,01$) e 2,66 ($P<0,05$) vezes mais do que os animais Piau nos pesos de abate 30 Kg e 60 Kg, respectivamente (Figura 6).

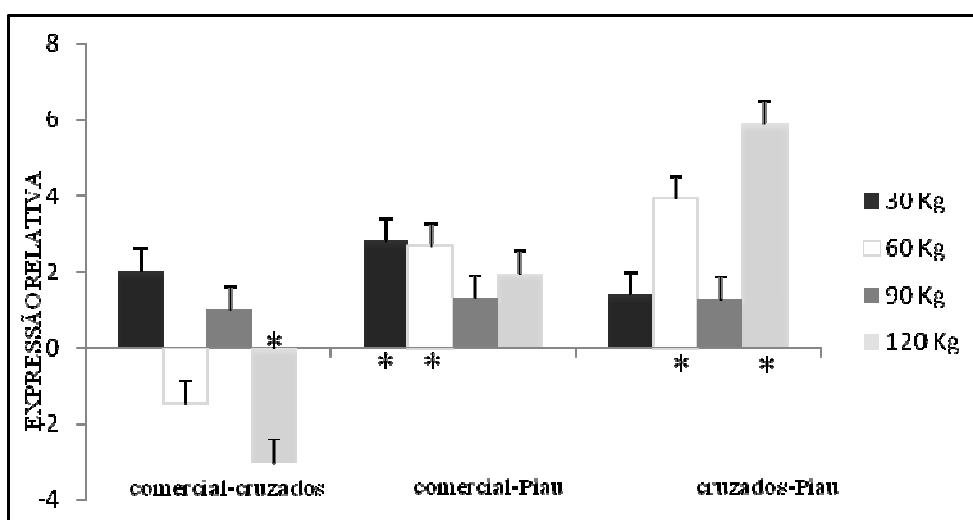


Figura 6- Comparação da expressão relativa do gene EPOR (receptor de eritropoetina) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30 60, 90 e 120 Kg). O * indica o grupo que apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

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

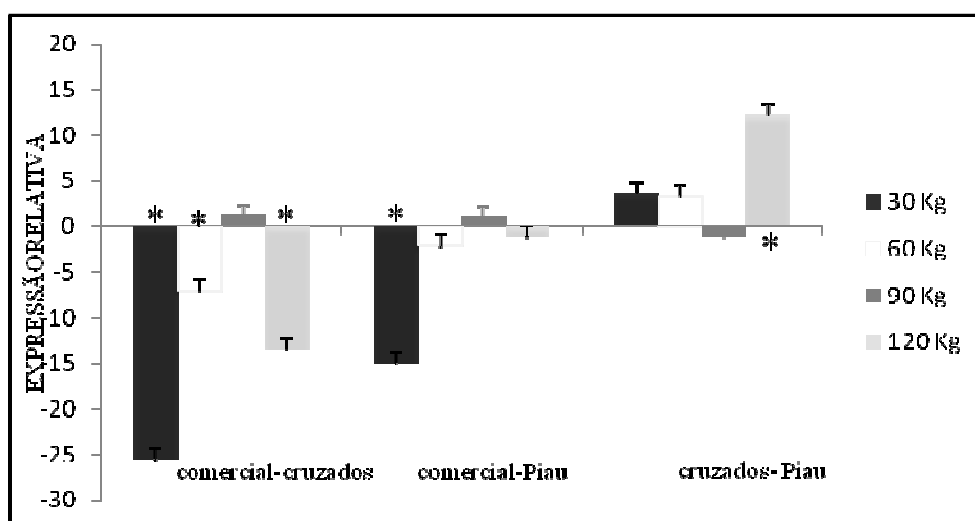


Figura 7- Comparação da expressão relativa do gene MyoD1 (diferenciação miogênica) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O * indica o grupo que apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se a expressão do gene do IGF2 6,44 ($P<0,05$) maior nos animais comerciais do que nos animais Piau no peso de abate de 60 Kg (Figura 8). Para o gene IGF2 também se observou no presente trabalho, o efeito quadrático significativo da co-variável gordura intramuscular ($P< 0,001$) e de acordo com as estimativas dos coeficientes de regressão, $b_1=-6,6239$ ($P=0,0115$) e $b_2=2,3723$ ($P=0,0023$), nota-se que a expressão do IGF2 é mínima para o valores de gordura intramuscular em torno de 1,3960% na carne fresca.

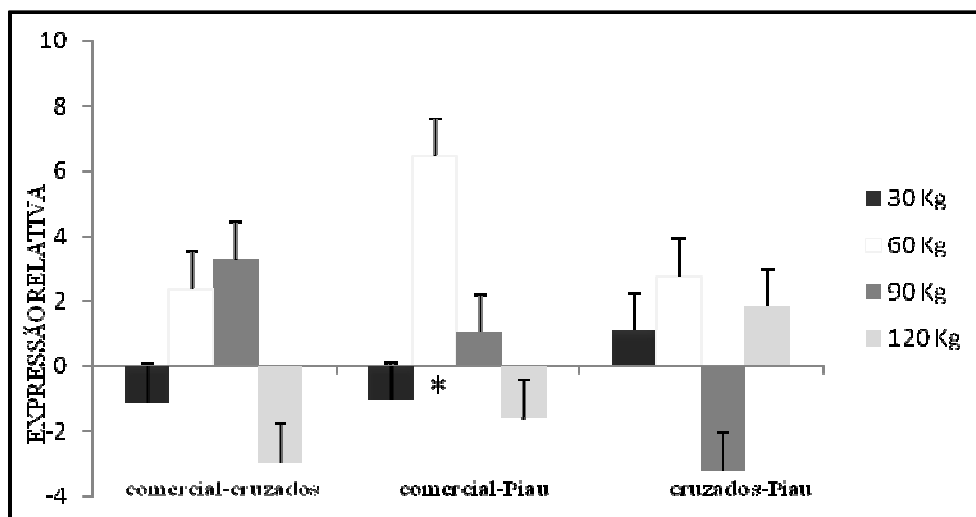


Figura 8- Comparação da expressão relativa do gene IGF2 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2) entre o grupo genético comercial-cruzados; comercial-Piau e cruzados-Piau nas diferentes idades de abates (30, 60, 90 e 120 Kg). O * indica o grupo que apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Discussão

A estratégia de utilização de grupos genéticos divergentes pode ser usada para estudos de genes candidatos, uma vez que aumenta a chance de se encontrar variação alélica do gene entre os grupos. Suínos Piau, tipo banha e suínos da linha comercial, tipo carne utilizados no presente trabalho mostram-se divergentes em relação à deposição de tecido adiposo na carcaça.

No SSC1 encontra-se o gene calpaína 3 expresso quase que exclusivamente nos músculos esqueléticos (Sorimachi et al. 1989). As calpaínas são uma família de enzimas proteolíticas neutras (calpaína I, m-calpaína e p94, também conhecidas como calpaína 1, 2 e 3, respectivamente), que se caracteriza pela sua atividade proteolítica sendo dependente da concentração de Ca^{+2} (Dayton, 1982). Sendo uma enzima proteolítica, a CAPN3 tem papel importante na integridade das células musculares e na retenção da água na carne uma vez que esta se liga a proteínas, assim apesar da degradação de proteínas ser um processo natural que acontece na carne *post mortem*, maiores expressões do gene CAPN3 poderiam aumentar e acelerar essa degradação das proteínas, o que resultaria em maior perda de água na carne e consequentemente também maior maciez da carne. As enzimas proteolíticas provocam algumas alterações no tecido muscular que causam uma diminuição da rigidez e aumento gradativo da maciez da carne, importante característica do ponto de vista econômico; existindo evidências de que

as calpaínas são responsáveis por 90% ou mais do processo de tenderizaçãoda carne no *post mortem* (Goll et al., 2003)

Segundo, Huff-Lonergan & Lonergan (2005) menores níveis de calpaína *post mortem* por meio do aumento da expressão do gene da calpastatina reduzem a degradação de proteína e com isso reduz a formação de canais de gotejamento na carne. Melody et al. (2004); Zhang et al. (2006); Scheffler & Gerrard (2007) têm demonstrado que a degradação protéica tem papel importante na perda de água na carne *post mortem*. Segundo Armstrong (1990), aumento nas concentrações de Ca^{+2} nas fibras musculares *post mortem* é uma fonte de ativação de proteases cálcio dependentes, de fosfatases e de fosfolipases, como o sistema calpaína que influencia a perda de água por gotejamento na carne. Lobiois et al. (2008) encontraram a expressão diferencial do gene CAPN3 em suínos provenientes do cruzamento de animais de linha comercial pela técnica de microarranjo.

No presente estudo um alto nível de expressão de calpaína foi encontrado na raça Piau, contudo os QTL previamente identificados para a perda total (efeito aditivo=0,812) e perda de cozimento (efeito aditivo=0,723) foram associados aos alelos vindos da linha comercial. Contudo, a contribuição da atividade das calpaínas na determinação da capacidade de retenção de água no processo de conversão do músculo para carne é complexa e dinâmica (McBryan et al., 2010) e maiores estudos nos genes da família das calpaínas são necessários.

Sob os QTL para perda total e perda por cozimento no SSC1, estão os genes codificadores de colágeno, de acordo com os dados do GO, o colágeno é um componente da matriz extracelular que tem como função a adesão celular; assim maiores ou menores adesões entre as células ou entre as células e a matriz extracelular poderiam estar associadas com perda de água na carne, corroborando com essa suposição McBryan et al. (2010) correlacionaram o aumento da expressão do gene COL1A1 (colágeno tipo 1 α -1) e o decréscimo da expressão do gene calpastatina com aumento de perdas por gotejamento na carne em suínos Large White. Ponsuksili et al. (2008) encontraram correlação positiva da expressão do gene COL1A1 (colágeno tipo 1 α -1) com perda por gotejamento em uma população formada por animais F2 Pietrain e Duroc. No presente trabalho, os genes COL9A1 e COL10A1 foram diferentemente expressos nos animais cruzados e Piau, sendo que os animais Piau apresentaram perda de peso total na carne (perda por cozimento + perda por gotejamento) 10,8% menor que os animais da linha comercial (Benevenuto Júnior et al. 2001).

Vários estudos demonstrarem que as propriedades do colágeno como: tamanho da fibra, tipo genético, conteúdo total e solubilidade estão intimamente relacionados com a textura da carne (Bailey, 1985). Segundo, Lawrie (2005), grande parte da variação no conteúdo de tecido conectivo se deve ao efeito genético; assim, a diferença de expressão de genes codificadores de colágeno na raça Piau e cruzados; assim como da CAPN3 poderiam continuar sendo avaliadas em estudos futuros, com o propósito de investigar e melhor entender a correlação da expressão de desses genes com maciez da carne e perda de água na carne.

De acordo com os dados do GO, o gene EPOR é um membro da família de receptores de citocina, que são proteínas que regulam as funções celulares. Após a vinculação com eritropoetina, o receptor de eritropoietina ativa a tirosina quinase Jak2 que ativa diferentes vias intracelulares, como por exemplo, fatores de transcrição (STAT5A) *in vivo*; essas informações não poderiam explicar diretamente a influência do gene EPOR nos QTL para pH45 ou nos QTL para corte de carcaça, ambos associados aos alelos da linha comercial, mapeados no SSC2. Contudo, Wimmers et al. (2007) encontraram após análises de expressão (Microarranjo, RT-qPCR) e de polimorfismo, o gene *EPOR* como candidato a influenciar pH 24 horas post mortem ($P < 0,003$) e perda por cozimento em Longissimus dorsi em suínos cruzados Duroc e Pietrain. Assim maiores estudos nesse gene, diferencialmente expresso em animais comerciais e cruzados, poderão ser feitos nos grupos genéticos do presente trabalho, com intuito de encontrar variantes alélicas associadas a pH post mortem; uma vez que essa característica é de suma importância para qualidade da carne suína, pois animais que tem grau de acidez menor têm menor desnaturação protéica, consequentemente menor perda de água na carne.

Alguns genes já foram identificados como responsáveis pela diferenciação e pelo número das fibras musculares: MyoD1, myf-5 e miogenina, e outros, no processo de hipertrofia, como GH (hormônio de crescimento), IGF, myf-6, Calpaína e Calpastatina (Lodish et al., 1995; te PAS et al., 1999a). QTL para PL, AOL e PROLOMB associados aos alelos da linha comercial foram encontrados na região dos genes IGF2 e MyoD1 no SSC2.

O IGF2 está envolvido em processos de proliferação e diferenciação de células satélites (Florini et al., 1991; Oksbjerg et al., 2004); células responsáveis pelo crescimento muscular pós-natal. Segundo, Van Laere et al. (2003), a mutação causada por uma substituição no íntron 3 neste gene (IGF2-intron3-G3072A) estaria associada a

maiores desenvolvimento muscular em suínos e teve sua frequência aumentada acidentalmente na seleção de animais para desempenho e produção de carne magra, estando ausente nas populações de Meishan e suínos selvagens. Gardan et al. (2008) também observaram em músculo esquelético o aumento na expressão do gene IGF2 ($P<0,01$) em suínos que possuíam essa mutação em relação aos animais que não a possuíam. Observou-se no presente trabalho a expressão significativa do gene IGF2 somente nos animais comerciais no peso de abate de 60 Kg; animais selecionados para desempenho.

Os genes da família MyoD (myo-DI, myf-5, miogenina e myf-6 ou mfr-4) também, estão envolvidos no desenvolvimento muscular dos mamíferos, possuindo estrutura semelhante e parecem ser capazes de se substituírem com um certo grau de eficiência. Contudo, no presente trabalho maiores nível de expressão do gene MyoD1 foram encontrados nos animais cruzados em diferentes pesos de abate e em animais Piau, com menor desenvolvimento muscular que animais comercial, na idade de abate de 30 Kg. Verne et al. (2007) encontraram diferentes influências entre polimorfismos no gene do MyoD1 com gordura intramuscular, no gene da miogenina com espessura de toucinho, no gene Myf5 com gordura intramuscular e conteúdo de carne magra.

Wyszyńska-Koko et al. (2006), encontraram SNP no myf-6 associados a maiores peso de lombo e pernil em linha comercial de suínos. Hui-Liang et al. (2006) encontraram polimorfismos no gene da miogenina associados com peso ao nascimento e espessura de toucinho. Schierholt (2005) não encontraram polimorfismo no gene miogenina entre suínos Piau e fêmeas comerciais (Landrace X Large white X Pietrain) associados com características de interesse econômico. Carmo et al. (2005) encontrou variantes alélicas do gene myf-5 ($P<0,05$) na população F2 (Piau X linha comercial) onde foram mapeados os QTL apresentados no presente trabalho, associada a perda por gotejamento, perda por cozimento e perda total. Knoll et al. (1997), estudando suínos das raças Landrace, Large White, Duroc e Pietran, descreveram polimorfismos de restrição para a enzima DdeI no gene MyoDI correlacionados com produção da carne. Assim, para se ter uma real dimensão dos efeitos dos genes que atuam sobre o desenvolvimento muscular, devem ser estudadas também as interações entre suas variantes alélicas.

A identificação de genes com variação no nível de expressão associado a QTL não necessariamente irão identificar os genes que controlam a característica, mas provem maiores informações a cerca da genômica envolvida no desenvolvimento de

características quantitativas, que envolve a maioria das características de importância econômica na produção animal, gerando informação adicional aos programas de melhoramento, aumentando sua acurácia, seu direcionamento e sua velocidade de implementação.

Conclusão

Diante das evidências experimentais associando os genes CAPN3, COL12A1, COL15A1, MyoD1, IGF2 e EPOR diferentemente expressos entre os grupos genéticos Piau, comercial e cruzados, com características de suma importância econômica na produção de suínos; todos esses genes podem ser considerados promissores para futuras análise, com o intuito de seqüenciá-los e procurar por mutação causal associada a essas características. Encontrando-se nas raças naturalizadas um campo de variabilidade a ser explorado.

Referências

- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis* (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- ARMSTRONG, R.B. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Medicine Science Sports Exercise**, 22, 429-435, 1990.
- BAILEY, A. J., LIGHT, N. D. *CIBA Found. Symp.* 114, 80–96, 1985.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Relationship between the Porcine Stress Syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v,28, p.88-91, 2005.
- BENEVENUTO JÚNIOR, A. A. **Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- CARMO, F.M.; GUIMARÃES, E.F.S.; LOPES, P.S. Association of MYF5 gene allelic variants with production traits in pigs. **Genetics Molecular Biology**, v.28, p.363-369, 2005.
- DAYTON, W. R. Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.709, n.2, p.166–172, 1982.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634-640, 2006.
- FLORINI, J. R.; EWTON, D.Z.; MAGRI, K. A. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. **Annu. Review Physiology**, v.53, p.201–216, 1991.
- GARDAN, D.; GONDRET, F.; VAN DEN MAAGDENBERG, K. Lipid metabolism and cellular features of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in pigs

- differing in IGF-II genotype. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, n.1, p.45-53, 2008.
- HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S.M. Mechanisms of water holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, v.71, p.194-204, 2005.
- HUI-LIANG, X.; ZHONG-XIAO, Z. Effects of the MyoG Gene on the Partial Growth Traits in Pigs. **Acta Genetica Sinica**, v.33, n.11, p.992-997, 2006
- JENNEN, D.G.J.; BRINGS, A.D.; LIU, G. Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.124, p.2-11, 2006.
- KNOLL A., NEBOLA, M., DVORAK, J. et al. Detection of a DdeI PCR-RFLP within intron 1 of the porcine MYOD1(MYF3) locus. **Animal Genetics**, v 28, n. 4, p. 321-325, 1997.
- LAWRIE, R. A. 2005 **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 384.
- LIVAK, K. J., SCHMITTIGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCt method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LOBJOIS, V.; LIAUBET, L.; SANCRISTOBAL, M. A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. **Animal Genetics**, v.39, p.147-162, 2008.
- LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A. et al. **Molecular Cell Biology**, 3.ed., cap.13, p.556-561, 1995.
- LIU, G.; JENNEN, D. G. J.; THOLEN, E. et al. A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. **Animal genetics**, v.38, n.3, p. 241-52, 2007.
- MCBRYAN, J.; HAMILL, M.R.; DAVEY, G. Identification of suitable reference genes for gene expression analysis of pork meat quality and analysis of candidate genes associated with the trait drip loss. **Meat Science**, v.86, n.2, p.436-9, 2010.
- MELODY, J.L.; LONERGAN, S.M.; ROWE, L.J. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. **Journal Animal Science**, v.82, p.1195-1205, 2004.
- OKSBJERG N., GONDRET F., VESTERGAARD, M. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.219-40, 2004.
- PAIXÃO, D. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; SILVA FILHO, M.I. Detecção de Locos de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 e 18 para características de desempenho em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1781-1787, 2008a.
- PAIXÃO, D. M.; SILVA FILHO, M. I.; PEREIRA, M. S. Detection of quantitative trait loci on chromosomes 16, 17 and 18 for carcass, internal organs and meat quality traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.98-901, 2008b.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.45, 2001.
- PFAFFL, M.W.; GEORGIEVA, T.M.; GEORGIEV, I.P. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF, IGF-2 receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, p.91, 2002.

- PONSUKSILI, S.; JONAS, E.; MURANI, E. Trait Correlated Expression Combined With Expression Qtl Analysis Reveals Biological Pathways And Candidate Genes Affecting Water Holding Capacity Of Muscle. **BMC Genomics**, v.9, p.367, 2008.
- SCHEFFLER, T.L.; GERRARD, D.E. Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. **Meat Science**, v.77, p.7-16, 2007.
- SCHIERHOLT, A. S. **O gene da miogenina: seqüenciamento em suínos e análise filogenética**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT® 9.2 User's Guide**, 2nd ed. Cary, NC, 2009.
- SERÃO, N.; RIBEIRO, A.; VERARDO, L. et al. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Animal Breeding and Genetics**, JABG-09-0151.R2. 2010 (aprovado).
- STEIBEL, J.P.; POLETO, R.; COUSSENS, P. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, 94, 146–152, 2009.
- SOLLERO, B. P. **Transcriptional profiling during pig skeletal muscle development of a brazilian local breed and two commercial genetic groups**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 134p. Thesis (Doctor Animal Science) - Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- SORIMACHI, H.; IMAJOH-OHMI, S.; EMORI, Y. Molecular cloning of a novel mammalian calcium- dependent protease distinct from both m- and p-types specific expression of the mRNA in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.33, p.20106–20111, 1989.
- VAN LAERE, A.S.; NGUYEN, M.; BRAUNSCHWEIG, M. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature**, v.425, p.832–6, 2003.
- VERNER, J.; HUMPOLÍČEK, P.; KNOLL, A. Impact of MYOD family genes on pork traits in Large White and Landrace pigs. **Journal Animal Breeding Genetics**, v.124, n.2, p.81-85.
- VIDAL, O.; VARONA, L.; OLIVER, M. A. Malic enzyme 1 genotype is associated with backfat thickness and meat quality traits in pigs. **Animal Genetics**, v.37, p.28–32, 2006.
- ZHANG, W.G.; LONERGAN, S.M.; GARDNER, M.A. Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and μ -calpain to variation in water holding capacity of pork. **Meat Science**, v.74, p.578-585, 2006.
- WIMMERS, K.E.; MURANI, M.F.; TE PAS, K.C. Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. **Animal Genetics**, v.38, p.474–484, 2007.
- WYSZYNSKA-KOKO, J.; PIERZCHALA, M.; FLISIKOWSKI, K. et al. Polymorphisms in coding and regulatory regions of the porcine MYF6 and MYOG genes and expression of the MYF6 gene in m. longissimus dorsi versus productive traits in pigs. **Journal Applied Genetics**, v.47, p.131–138, 2006.

CAPÍTULO IV

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

RESUMO - Nos últimos anos, com a busca por uma maior eficiência e qualidade na produção animal, tem crescido o interesse pelo uso de marcadores moleculares tanto na seleção de reprodutores, como no auxílio para identificação de paternidade e rastreabilidade animal. Objetivou-se com este trabalho avaliar um painel de marcadores microssatélites eficiente para ser empregado em testes de paternidade e rastreabilidade em suínos. Para tanto, uma população composta por uma progênie de 130 animais gerados a partir do cruzamento de 32 animais parentais de diferentes raças foi genotipada para 28 marcadores microssatélites e foram estimados o conteúdo de informação polimórfica (PIC), a probabilidade de dois animais não aparentados apresentarem o mesmo genótipo (PI) e as probabilidades de exclusão de paternidade combinada para as situações em que somente o genótipo de um dos pais era conhecido (P_1) e para a situação em que os genótipos da mãe e do pai estavam disponíveis (P_2). Para formar um painel com o menor número de marcadores eficientes para serem empregados em testes de paternidade e rastreabilidade em suínos, os marcadores que apresentaram individualmente as maiores P_1 foram sendo adicionados ao painel até que em conjunto atingissem uma $P_1 \geq 99,99\%$. O conjunto de 28 marcadores microssatélites avaliados apresentaram P_1 e P_2 superiores a 99,99% e PI igual a 0,74 e $4,25 \times 10^{-30}$. O painel com o menor número de marcadores atingiu $P_1 \geq 99,99\%$, PI de $3,67 \times 10^{-19}$ e foi composto por 15 microssatélites. Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o painel formado por 15 marcadores microssatélites foi altamente informativo e pode ser considerado adequado para análises de paternidade e de rastreabilidade em suínos.

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

Evaluation of microsatellites markers for paternity and traceability analyses in pigs

ABSTRACT - In recent years, due the search for greater efficiency and higher quality in animal production, it has been observed a growing interest in the use of molecular markers in animal selection and as well for paternity identification and animal traceability. The goal of the current study was to form an efficient panel of microsatellites to be employed in paternity testing and traceability in pigs. In order to reach the objective, a population composed of 130 offspring generated crossing 32 parental animals of different breed were genotyped with 28 microsatellite markers and were estimated the polymorphic information content (PIC), the probability of two unrelated animals presented the same genotype for all markers (PI) and combined exclusion probability of paternity for the situations where only the genotype of one parent was known (P1) and when the genotypes of both parents were available (P2). To form a panel with the lowest number of effective markers to be used in paternity testing and traceability in pigs, the markers that showed the greatest individual P1 were added to the panel till they reach together a $P1 \geq 99.99\%$. The set composed of all 28 microsatellite evaluated showed P1 and P2 higher than 99.99% and PI equal 4.25×10^{-30} . The panel with the smallest number of markers that reached $P1 \geq 99.99\%$, PI of 3.67×10^{-19} and was composed of 15 microsatellites. The results presented in this study suggest that the panel of 15 microsatellites was highly informative and can be considered suitable for paternity analysis and traceability in pigs.

Keywords: paternity exclusion, Piau, animal identification.

Introdução

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

Por meio dos testes de DNA é possível eliminar erros nos registros de pedigree, aumentando a acurácia na predição do valor genético de um indivíduo, assegurando o sucesso dos programas de melhoramento, uma vez que inúmeros estudos têm mostrado que os erros de pedigree reduzem o ganho genético (Van vleck, 1970; Ron et al., 1996; Carneiro et al., 1999; Israel & Weller, 2000; Banos et al., 2001; Sanders et al., 2006) e consequentemente diminuem os ganhos econômicos.

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

Diferentes tipos de marcadores estão disponíveis para análises de identificação animal e verificação de dados de pedigree. Os marcadores microssátélites têm sido um dos marcadores mais utilizados nessas análises, pois são marcadores co-dominantes, abundantes no genoma e altamente polimórficos. Além disso, os primers flanqueadores

dos locos de microssatélites podem ser obtidos através da consulta a banco de dados on line (<http://www.animalgenome.org/> e www.isag.org), o que confere simplicidade na escolha dos locos a serem utilizados para verificação de paternidade.

O principal propósito da realização do presente trabalho foi formar um painel de marcadores microssatélites eficiente para ser empregado em testes de paternidade e rastreabilidade em suínos.

Material e Métodos

Uma população composta por 176 animais foi genotipada para 28 marcadores microssatélites. Tal população foi composta: por uma progênie de 62 animais gerados a partir do cruzamento de 2 machos da raça Piau com 18 fêmeas cruzadas (LandraceX Large WhiteX Pietrain), uma progênie de 24 animais gerados a partir do cruzamento de 4 machos com 6 fêmeas da raça Piau, uma progênie de 25 animais gerados a partir do cruzamento de 3 machos e 5 fêmeas de linha comercial da TOPIGS, uma progênie de 14 animais gerados a partir do cruzamento de 3 machos e 3 fêmeas cruzadas (LandraceX Large WhiteX Pietrain) e uma progênie de 5 animais gerados a partir do cruzamento animais DUROC. A extração, manipulação e subsequente análise do DNA genômico foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia animal (LABTEC) do Departamento de Zootecnia da UFV. O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue coletado imediatamente após o abate utilizando-se o método de extração por precipitação com sal (Miller et al., 1988), ou por meio de amostras de pêlo ou tecido da cauda (no caso de leitões) utilizando tampão de extração contendo: Tris HCL pH 8.0 1 M, EDTA 0,5 M, NACL 5 M, SDS 1% e RNase A (10 µg/µL).

A escolha dos primers de microssatélites a serem avaliados foi baseada na disponibilidade e informatividade dos marcadores, doados pelo coordenador do U.S. Pig

Genome (USDA-Cooperative State Research, Education, and Extension Service through National Research Support) e usados previamente em estudos de mapeamento genômico concluídos no LABTEC. As reações de PCR foram realizadas utilizando termocicladores MJ Research PTC 100-96® com Master Mix Gotaq® Green Master (Promega Corporation, Madison, EUA) e cada 12 µL de reação possuiu 25ng de DNA genômico.

Os seguintes microssatélites foram usados: SW2035, S0112, SW2443, SW240, SW395, S0036, S0002, SW58, SJ024, SW1987, SW1057, S0003, S0228, S0064, S0212, S0017, SW21, SW830, S0071, S0106, SW344, SW857, SW936, SW2517, SW2427, S0120, SW980 e S0218. As sequências dos primers desses marcadores podem ser acessadas em USDA MARC Map (<http://www.marc.usda.gov/genome/swine/swine.html>).

Os fragmentos amplificados foram analisados em eletroforese capilar no ABI 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystem™, utilizando o software Genescan® e GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no Laboratório de Genômica, Bioagro-UFV. A probabilidade de exclusão de paternidade de cada microssatélite e posteriormente, as probabilidades de exclusão combinada de todos os marcadores: P_1 (somente o genótipo de um dos pais é conhecido) e P_2 (o genótipo do pai e da mãe são conhecidos); a PI (probabilidade de dois indivíduos não aparentados apresentarem o mesmo genótipo) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) usado para quantificar a informatividade dos marcadores (Bolstein et al., 1980) foram estimadas baseado nas frequências alélicas obtidas por meio do Programa CERVUS (Kalinowski et al., 2007).

Para formar um painel com o menor número de marcadores eficientes para serem empregados em testes de paternidade e rastreabilidade em suínos, os marcadores que

apresentaram individualmente as maiores P_1 foram sendo adicionados ao painel até que em conjunto atingissem uma $P_1 \geq 99,99\%$.

Resultados e Discussão

O grau de informatividade de um marcador pode ser relacionado com o valor de PIC, P_1 , P_2 e PI que são diretamente influenciados pelo número de alelos e suas respectivas frequências na população alvo. Os 28 marcadores avaliados neste estudo (Tabela 1) apresentaram em média 7 alelos por loco, variando de três (S0218) a 11 (SW1987, SW2517 e S0212). A P_1 individual variou de 0,25 (SW2427) a 0,62 (SW1987) e a P_2 variou de 0,30 (S0218) a 0,77 (SW1987). Conforme mostrado por Jamieson & Taylor (1997), o aumento no número de alelos de um marcador tende a aumentar a probabilidade de exclusão de paternidade. Essa característica é um dos grandes diferenciais dos microssatélites em comparação aos marcadores SNPs que são em geral bialélicos. Dependendo do número de alelos do microssatélite serão necessários vários marcadores SNPs para se obter a mesma probabilidade de exclusão de um único microssatélite.

Tabela 1 - Número de animais genotipados e de alelos por locos; conteúdo de informação polimórfica (PIC); probabilidade de exclusão de paternidade para os casos em que o genótipo de apenas um dos pais é conhecido (P_1); probabilidade de exclusão de paternidade quando o genótipo de ambos os pais é conhecido (P_2) e probabilidade de dois indivíduos não aparentados apresentarem o mesmo genótipo (PI)

Marcadores	Animais	Alelos	PIC	P_1	P_2	PI
*SW1987	175	11	0,87	0,62	0,77	0,02
*SW980	120	5	0,74	0,55	0,55	0,22
*SW2517	179	11	0,83	0,54	0,70	0,04
*S0106	172	7	0,83	0,50	0,69	0,04
*SW344	171	9	0,82	0,50	0,68	0,05
*S0212	186	11	0,81	0,50	0,67	0,05
*S0064	167	9	0,81	0,49	0,67	0,05
*SW1057	167	7	0,80	0,48	0,65	0,05
*S0002	178	7	0,79	0,46	0,64	0,06
*SW2443	178	6	0,79	0,46	0,63	0,06
*S0112	179	6	0,76	0,42	0,60	0,07
*SW240	173	7	0,76	0,42	0,60	0,07
*S0017	167	8	0,75	0,41	0,60	0,07
*SW2035	170	6	0,76	0,41	0,59	0,08
*SW395	178	7	0,76	0,41	0,59	0,08
S0003	172	6	0,74	0,39	0,57	0,08
S0228	171	5	0,74	0,38	0,56	0,09
SW857	60	5	0,74	0,38	0,56	0,09
S0218	137	3	0,44	0,36	0,30	0,31
SW936	170	5	0,71	0,35	0,53	0,10
SW58	164	6	0,70	0,34	0,53	0,10
SW21	173	6	0,71	0,34	0,52	0,11
SW830	171	5	0,70	0,33	0,51	0,11
S0036	170	4	0,68	0,30	0,48	0,12
SJ024	170	6	0,66	0,29	0,48	0,13
S0071	170	6	0,65	0,29	0,47	0,13
S0120	170	9	0,63	0,28	0,45	0,15
SW2427	172	5	0,61	0,25	0,41	0,17
Probabilidade conjunta				0,9999	0,9999	$4,25 \times 10^{-30}$

*Microssatélites que formam o painel com o menor número de marcadores que em conjunto apresentam $P_1 > 99,99\%$.

O PIC médio observado foi de 0,73 ressaltando a informatividade destes marcadores, já que segundo Bolstein et al.(1980), um PIC maior que 0,5 caracteriza o marcador como altamente polimórfico. Avaliando a probabilidade de exclusão destes

marcadores foram observadas P_1 e P_2 superiores a 99,99%. Isso indica que o conjunto de 28 marcadores avaliados é eficiente para a verificação ou identificação de paternidade. Porém, um dos maiores limitantes do uso dos testes de paternidade por meio da análise de DNA nos programas de melhoramento é o custo da genotipagem. Portanto, a escolha de marcadores mais informativos faz com que menos marcadores sejam necessários, e com isso, reduz o custo do teste.

Diante disto foi avaliado um painel com um número reduzido de marcadores agrupando aqueles com as maiores P_1 . Observou-se que dos 28 marcadores do presente estudo, foi possível formar um painel reduzido com 15 marcadores, com P_1 e P_2 superiores a 99,99%, esses resultados sugerem com um alto grau de confiança a exclusão de paternidade para qualquer cruzamento entre as raças de suínos estudadas.

Para estes 15 marcadores foi observado uma média de 8 alelos por loco, variando de cinco (SW980) a 11 (SW1987, SW2517 e S0212). A P_1 individual variou de 0,41 (SW2035, SW395 e S0017) a 0,62 (SW1987), a P_2 variou de 0,57 (S0017) a 0,77 (SW1987) e o PIC médio observado foi de 0,78. Excluindo o marcador com menor P_1 dentre esses 15 marcadores, ainda sim é observado altos valores de exclusão de paternidade ($P_1 = 99,98\%$ e $P_2 = 99,99\%$).

Para formar o painel com o número reduzido de marcadores foram escolhidos os marcadores que apresentaram maior P_1 , probabilidade de exclusão quando somente o genótipo de um dos pais é conhecido. Isso se deve ao fato de que nos programas de melhoramento atual, na maior parte das vezes somente o pai da progênie é genotipado. Portanto, o alto valor observado para P_1 dos 15 marcadores do painel reduzido é bastante interessante, uma vez, que este conjunto de marcadores tem se mostrado eficaz na exclusão da paternidade, além de possibilitar uma redução com os gastos das análises moleculares por meio do uso de menos marcadores e por dispensar os custos adicionais

com as genotipagens das mães, tornando os testes de paternidade mais atrativos para a indústria.

Valores altos de probabilidade de exclusão em suínos também foram evidenciados por Rohrer et al. (2007), que encontraram para um painel formado por 10 marcadores (SW21, SW818, SW1370, SW1824, SWR1829, SW1891, SW1904, SW2156, SW2519 e SW2527), média de alelos de 10,6 por loco, painel variando de seis alelos (SW21) a 13 alelos (SW2156), P_1 de: 99,81% e P_2 de 99,99% em população de suínos comerciais (Duroc, Hampshire, Landrace e Yorkshire). Para o painel formado por 10 marcadores neste estudo (SW1987, SW980, SW2517, S0106, SW344, S0212, S0064, S1057, S0002 e SW2443) encontrou-se P_1 99,85%, e P_2 de 99, 99%. Schwarz et al. (2005) recomendaram para teste de paternidade em uma linha comercial de suínos Landrace o uso dos marcadores: S0097, S0105, S0106, S0230, SW129, SW344, SW1808, SW2441, SW2517 e SWR1101 por possuírem alto número de alelos com frequências iguais; os marcadores S0106, SW344 e SW2517 também foram usados no presente estudo para formar o painel com 15 marcadores.

Nechtelberger et al. (2001) com um conjunto de 15 microsatélites (S0005; S0090; S0101; S0155; S0355; S0386; SW24; SW240; SW857; SW951; SW72; SW936; SW911; S0228; S0227) observaram probabilidade de exclusão de paternidade em suínos nas raças Landrace de $P_1=99,87\%$ e $P_2=96,69\%$, Piétrain de $P_1=99,92\%$ e $P_2=98,35\%$ e de Large White de $P_1=99,98\%$ e $P_2=99,09\%$. O marcador SW240 recomendados pelo ISAG (International Society for Animal Genetics), órgão que regulamenta os laboratórios credenciados para fazer teste de paternidade, também foi usado no presente estudo para formar o painel reduzido com 15 marcadores.

A procura de marcadores genéticos que são capazes de discriminar cada animal vêm se tornando cada vez mais uma realidade. Debate-se sobre como o sistema de

rastreamento deve funcionar e vários autores vêm comparando, em suas publicações, a eficácia de diferentes métodos de rastreabilidade (Meuwissen, et al., 2003; Marchant, 2002; Barcos, 2001).

A PI combinada do painel formado por 15 marcadores microssátélites neste trabalho foi igual a $3,67 \times 10^{-19}$. Isso significa que a chance de dois animais não aparentados terem os mesmos genótipos para todos os 15 microssátélites é de um em $2,72 \times 10^{18}$. Estes resultados sugerem que os marcadores avaliados poderiam ser eficientes para a identificação de suínos sendo empregados em análises de rastreabilidade, uma vez que, a população mundial de suínos é de aproximadamente um bilhão de animais (FAO, 2008). Rohrer et al. (2007), encontraram PI de $5,4 \times 10^{-13}$, utilizando 10 marcadores microssátélites em linhas comerciais de suínos.

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

Conclusões

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o painel de marcadores composto por 15 marcadores microssátélites formado a partir de 28 marcadores microssátélites seria suficiente para um poder de exclusão de paternidade superior a 99,99% e assim, uma importante ferramenta para auxiliar nos programas de melhoramento de suínos.

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

Literatura Citada

- BANOS, G.; WIGGANS, G.R.; POWELL, R.L. Impact of Paternity Errors in Cow Identification on Genetic Evaluations and International Comparisons. **Journal Dairy Science**, v.84, p.2523–2529, 2001.
- BARCOS, L. O. Recent developments in animal identification and the traceability of animal products in international trade. **Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics), v.20, n.2, p.640–651, 2001.
- BOLSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314–331, 1980.
- CARNEIRO, P.L.S.; EUCLIDES, R.F.; SILVA, M.A.E. et al. Efeito da seleção errônea de machos sobre ganhos genéticos, utilizando-se simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, p.264–268, 1999.
- DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M. Genetic Traceability of livestock products: A review. **Meat Science**, v.77, p.437–449, 2007.
- FAO [2008]. Live Animals. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor> Acesso em: 18-03-2010.
- JAMIESON, A.; TAYLOR, S.C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v.28, p.397–400, 1997.
- ISRAEL, C.; WELLER, J.I. Effect of Misidentification on Genetic Gain and Estimation of Breeding Value in Dairy Cattle Populations. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.1, p.181–187, 2000.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, n.5, p.1099–1106, 2007.
- MEUWISSEN, M.P.M., VELTHUIS, A.G.J., HOGEVEEN, H. et al. Traceability and certification in meat supply chains. **Journal of Agribusiness**, v.21, n.2, p.167–181, 2003.
- MARCHANT, J. **Secure animal identification and source verification**. JM Communications, UK. Copyright Optibrand Ltd., LLC, 2002.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C.; STUR, I. et al. DNA microsatellite analysis for parentage control in austrian pigs. **Animal Biotechnology**, v.2, p.141 – 144, 2001.
- ROHRER, G.A.; FREKING, B.A.; NONNEMAN, D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. **Animal Genetics**, n.38, v.3, p.253–258, 2007.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M. et al. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implications for Genetic Improvement. **Journal Dairy Science**, v.79, p.676–68, 1996.
- SANDERS, K.; BENNEWITZ, J.; KALM, E. Wrong and Missing Sire Information Affects Genetic Gain in the Angeln Dairy Cattle Population. **Journal Dairy Science**, v.89, p.315–321, 2006.
- SCHWARZ, S.; PRESUHN, U.; KALM, E.; REINSCH, N. Characterizing polymorphism and multiplex feasibility of 142 microsatellite markers from a commercial German Landrace line. **Archieve of Tierzucht**, v.48, p.490–493, 2005.

VAN VLECK, L. D. Misidentification in Estimating the Paternal Sib Correlation.
Journal of Dairy Science, v.53, n.10, p.1469-1474, 1970.

CONCLUSÃO GERAL

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

Encontrou-se nas regiões dos QTL associadas a características de interesse econômico em suíno no cromossomo 1 e no cromossomo 2, seis genes (CAPN3, COL12A1, COL15A1, EPOR, IGF2 e MyoD1) diferentemente expressos, candidatos a influenciar essas características.

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

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

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

LITERATURA CITADA

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA - ABIPECS [2010]. 2010, **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.abipecs.com.br>> Acesso em: 20/10/2010.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Relationship between the porcine stress syndrome gene and carcass and performance traits in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.92-96, 2005.
- BAND, G.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. (2005b). Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality traits of F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.88-91, 2005.
- BRYNE, P.F.; MCMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and candidate gene approach. **Probe**, v.7, p.24-27, 1996.
- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal Biomolecular Techniques**, v.15, p.155-166, 2004.
- DAÍ, F.; FENG, D.; CAO, Q. et al. Developmental differences in carcass, meat quality and muscle fibre characteristics between the Landrace and a Chinese native pig. **South African journal of Animal science**, v.39, n.4, 2009.
- DE VRIES, A.G.; FAUCITANO, L.; SOSNICKI, A. et al. The use of gene technology for optimal development of pork meat quality. **Food Chemistry**, v.69, p.397, 2000.
- ERKENS, T.; VAN POUCKE, M.; VANDESOMPELE, J. et al. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. **BMC Biotechnology**, v.6, p.41, 2006.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634-640, 2006.
- FARIA D. A.; PEIXOTO, J. O.; LOPES, P. S. et al. Association between insulin-like growth factor I microsatellite polymorphisms and important economic traits in pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.265-270, 2009.
- FÁVERO, J.A.; FIGUEIREDO, E.A.P. Evolução do melhoramento genético de suínos no Brasil. *Revista CERES*, v.54, p.420-427, 2009.
- GELDERMANN H.; PIEPER, U.; WEBER, W.E. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. **Journal Animal Science**, v.63, p.1759-68, 1986.
- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, n.15, p.27-28, 2001.
- HALEY, C. Advances in quantitative trait locus mapping, IN:CONFERENCE PROCEEDINGS: From J L Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics , 1999, p. 47-59.
- JANSEN, R.; NAP, J.P. Genetical genomics: the added value from segregation. **Trends Genetics**, v.17, p.388-391, 2001.
- KWASIBORSKI, A.; ROCHA, D.; TERLOUW, C. Gene expression in Large White or Duroc-sired female and castrated male pigs and relationships with pork quality. **Animal Genetics**, v.40, p.852-862, 2009.

- LOBJOIS V.; LIAUBET L.; SANCRISTOBAL M. et al. A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. **Animal Genetics**, v.39, p.147–62, 2008.
- NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C.; STUR, I. et al. DNA microsatellite analysis for parentage control in austrian pigs. **Animal Biotechnology**, v.2, p.141 – 144, 2001.
- PFAFFL, M.W.; GEORGIEVA T. M.; GEORGIEV I.,P. et al. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*, v.22, p. 91-102, 2002.
- PAIXÃO, D. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; SILVA FILHO, M.I. et al. Detecção de Loci de características quantitativas nos cromossomos 16, 17 e 18 para características de desempenho em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1781-1787, 2008a.
- PAIXÃO, D. M., SILVA FILHO, M. I., PEREIRA, M. S. et al. Detection of quantitative trait loci on chromosomes 16, 17 and 18 for carcass, internal organs and meat quality traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.898-901, 2008b.
- PEIXOTO, J. O.; FARIA, D. A.; SILVA, P. V. et al. Association between leptin gene single nucleotide polymorphisms and Carcass Traits in Pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.271-276, 2009.
- PELOSO, J.V. **Qualidade da carcaça e níveis de expressão dos genes FABP3 e FABP4 em suínos destinados à produção industrial de presuntos maturados**. 2006. 104f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- PINTO, A.P.G.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, M.S. et al. Análises de Loci Microsatélite para Detecção de QTL nos Cromossomos Nove, Dez e Onze de Suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA,1.,2008 Lavras. **Anais...**Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras/Gmosis, [2008]. (CD-ROM).
- PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, C. T. et al. Mapping quantitative trait loci for performance traits on pig chromosome 6 (SSC6). **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.15, p.25-32, 2007.
- PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F. et al.. Mapeamento de locos de características quantitativas associados à composição de carcaça, no cromossomo 6 de suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.725-732, 2008 a.
- PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F. et al. Mapeamento de locos de características quantitativas, no cromossomo seis suíno, associados às características de cortes de carcaça. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.725-732, 2008b.
- PONSUKSILI, S.; JONAS, E.; MURANI, E. et al. Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. **BMC Genomics**, v.9, p.367, 2008.
- PUTNOVÁ, L.; KNOLL, A.; DVOŘÁK, V. et al. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. **Czech. Journal Animal. Science**, v.48, n.8, p.307–314, 2003.

- ROHRER, G.A.; FREKING, B.A.; NONNEMAN, D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. **Animal Genetics**, n.38, v.3, p.253-258, 2007.
- SEATON, G.; HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. et al. QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v.18, n.2, p.339-340, 2002.
- SERÃO, N.; VERONEZE, R.; RIBEIRO, A. et al. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Animal Breeding and Genetics**, JABG; 09;0151.R2, 2010. (aprovado)
- SHCHWARZ, S.; PRESUHN, U.; KALM, E.; et al. Characterizing polymorphism and multiplex feasibility of 142 microsatellite markers from a commercial German Landrace line. **Archieve of Tierzucht**, v.48, p.490-493, 2005.
- SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E.F. et al. Utilização de marcadores genéticos em suínos. II. Características de desempenho e de qualidade da carne. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.1, p. 11-20, 2003a.
- SILVA, K.M., PAIXÃO, D.M., SILVA, P.V. et al. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.475-480, 2008.
- SILVA, K.M. , GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. et al. (2009). Mapeamento de Locos de Características Quantitativas para Desempenho no Cromossomo 4 de suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 474-479, 2009.
- SILVA, P.V.; GUIMARAES, S.E.F.; GUIMARÃES, J. D. et al. Expression Pattern Of P53 mRNA during the dstrous cycle in: swine. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 282-283, 2010.
- SILVEIRA, P.R.S.; CESCNETO, R.J.; ZANELLA, E.L. et al. Identificação de paternidade para avaliação da contribuição da primeira e segunda doses inseminantes na composição da leitegada suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.609-615, 2008.
- SOLLERO, B. P. **Transcriptional profiling during pig skeletal muscle development of a brazilian local breed and two commercial genetic groups**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 134p. Thesis (Doctor Animal Science) - Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- SOUZA, K.R.S.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, M.S. et al. Análise e uso de microssatélites na construção do mapa de ligação do cromossomo sete de uma população de suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1., 2008 Lavras. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras/Gmosis, [2008]. (CD-ROM).
- SOUZA, K.R.S.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, M.S. et al. Utilização dos marcadores microssatélites na construção do mapa de ligação do cromossomo oito de uma população de suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1., 2008 Lavras. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras/Gmosis, [2008]. (CD-ROM).
- SOUZA, K.R.S.; FROSSARD RIBEIRO, A.M.; NUNES GOES, P. R. et al. [2010]. Toll-Like receptor 6 differential expression in two pig genetic groups vaccinated against Mycoplasma hyopneumoniae. **Internacional Symposium on Animal Genomics for animal health**. Disponível em: <<https://colloque.inra.fr/var/agah2010/storage/fckeditor/file/abstract-book-web2.pdf>> Acesso em: 20/07/2010.

- TANG, R.; YU, B.; ZHANG, K. et al. Effects of nutritional level on pork quality and gene expression of μ -calpain and calpastatin in muscle of finishing pigs. **Meat Science**, v.85, p.768-771, 2010.
- WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, p.75-85, 2005.