

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Estudo do desequilíbrio de ligação entre marcadores no genoma de bovinos da raça Nelore

Rafael Espigolan¹, Fernando Baldi², Fabio Ricardo Pablos de Souza³, Daniel Gustavo Mansan Gordo⁴, Rafael Lara Tonussi⁵, Lucia Galvão de Albuquerque⁶

¹Aluno de mestrado em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista da CAPES. email: espigolan@yahoo.com.br

²Professor Doutor do Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

³Pós-doutorando em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista da CAPES

⁴Aluno de doutorado em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista do CNPq

⁵Aluno de mestrado em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/UNESP. Bolsista do CNPq

⁶Professora Titular do Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP. Pesquisadora do CNPq e INCT-CA

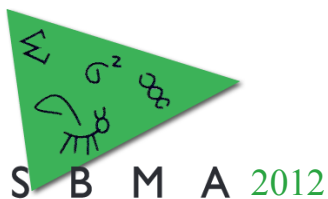
Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar o desequilíbrio de ligação em bovinos da raça Nelore utilizando painéis de marcadores SNPs de alta densidade (HD BovineSNP Beadchip). Foram utilizados 48 machos da raça Nelore, nascidos em 2008 e filhos de 28 touros e 48 vacas. Para a extração de DNA, cerca de 5 g de tecido muscular foram retirados de peças de carne correspondente ao músculo *Longissimus dorsi*. A extração de DNA do tecido muscular foi realizada utilizando-se o kit Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). O software GenomeStudio (Illumina®) foi utilizado para analisar as imagens do HiScan e obtenção dos genótipos. Um total de 445.755 (57,3%) marcadores atenderam aos critérios de filtragem e foram incluídos na análise final. Os SNPs foram uniformemente distribuídos entre os autossomos, uma vez que a densidade de marcadores foi semelhante para todos os autossomos, variando de 4,8 a 5,0 kb. O desequilíbrio de ligação entre dois SNPs foi avaliado utilizando o r^2 e o valor absoluto de D' . O LD diminuiu na medida em que a distância física entre os marcadores aumentou. As mudanças de $|D'|$ seguiram um padrão menos acentuado de declínio do LD. Níveis moderados de r^2 (entre 0,20 e 0,32) foram observados para distâncias entre marcadores inferiores a 30 kb. Quando a distância aumentou de 30 até 100 kb, o r^2 médio diminuiu de 0,20 para 0,13. As estratégias de mapeamento explorando LD podem ser particularmente eficazes em zebuínos, uma vez que a informação de desequilíbrio de ligação estimada para marcadores espaçados até 30 kb indica que a utilização do HD Bovine SNP BeadChip pode ser uma ferramenta viável na predição dos valores genéticos de animais da raça Nelore.

Palavras-chave: bovinos de corte, genômica, marcadores moleculares

Whole genome linkage disequilibrium in Nelore cattle

Abstract: The aim of this study was to evaluate the linkage disequilibrium (LD) in Nelore cattle using high-density panels of SNPs markers (HD BovineSNP Beadchip). A total of 48 Nelore steers born in 2008 from 28 sires and 48 dams were used. For DNA extraction, about 5 g of muscle tissue was removed from the *Longissimus dorsi* muscle. Muscle DNA extraction was performed using the Dneasy Blood and tissue Kit (Qiagen). The software GenomeStudio (Illumina®) was used to analyze the images and obtaining the HiScan genotypes. A total of 445,755 (57.3%) markers met the criteria and were included in the final analysis. The SNPs were evenly distributed between the autosomes, since the density of markers was similar for all autosomes, ranging from 4.8 to 5.0 kb. The linkage disequilibrium between two SNPs was evaluated using the r^2 and D' . The LD decreased with the increase in distance between markers. The decrease in $|D'|$ was less marked. Moderate levels of r^2 (between 0.20 and 0.32) were observed for distances between markers less than 30 kb. When the distance increased from 30 to 100 kb, r^2 average decreased from 0.20 to 0.13. The mapping strategies exploiting LD can be particularly effective in Zebu, since the information of linkage disequilibrium estimated for markers spaced up 30 kb indicates that using the HD Bovine SNP BeadChip for the prediction of animals genetic values can be a viable tool in Nelore.

Keywords: beef cattle, genomics, molecular markers



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Introdução

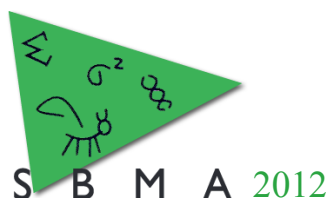
Recentemente, o valor genético dos animais pode ser obtido a partir de dados genômicos, através da chamada seleção assistida por marcadores considerando todo o genoma, ou seleção genômica (Calus et al., 2009). A seleção genômica explora o desequilíbrio de ligação (LD) entre os marcadores, onde o pressuposto é que os efeitos dos segmentos de cromossomos serão os mesmos em toda a população, uma vez que os marcadores estão em LD com os genes (QTL – *quantitative trait loci*) responsáveis pela expressão da característica. A estimação do LD é fundamental para determinar o número de marcadores que serão necessários para o mapeamento de QTL. Porém, existem poucos trabalhos de LD em bovinos da raça zebuína (Silva et al., 2010). Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o desequilíbrio de ligação em bovinos da raça Nelore utilizando painéis de marcadores SNPs de alta densidade (HD BovineSNP Beadchip).

Material e Métodos

Um total de 48 machos da raça Nelore, nascidos em 2008 e filhos de 28 touros e 48 vacas, pertencentes ao programa de melhoramento genético da Conexão Delta G foram utilizados no presente estudo. Para a extração de DNA, cerca de 5 g de tecido muscular foram retirados de peças de carne correspondente ao músculo *Longissimus dorsi*. As amostras de tecido muscular foram acondicionadas em tubos eppendorf de 2 mL identificadas com o número dos animais e armazenadas em freezers à -20°C. Posteriormente, foram pesadas alíquotas variando de 25 a 30 mg sob folha de alumínio em balança analítica. A extração de DNA do tecido muscular foi então realizada utilizando-se o kit Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). O software GenomeStudio (Illumina ®) foi utilizado para analisar as imagens do HiScan e obter os genótipos. O Bovine HD BeadChip possui 777.962 marcadores do tipo SNP espalhados pelo genoma com uma distância média entre os marcadores de 3,43 kb. Um total de 2.959 marcadores foram excluídos devido à posição genômica desconhecida e 280.229 marcadores foram monomórficos. Além disso, um total de 16.222 marcadores foram excluídos por apresentar intensidade média do cluster baixa. Para efeitos do presente estudo, apenas marcadores em cromossomos autossômicos com frequências de alelos menores (MAF) superiores a 0,05 foram incluídos na análise de LD, assim como marcadores com Call Freq maiores a 0,93 e excesso de heterozigotos (Het Excess) menores que 0,30 foram considerados. O desequilíbrio de ligação entre dois SNPs foi avaliado utilizando o r^2 e o valor absoluto de D' (Hill, 1981). As medidas de desequilíbrio de ligação (r^2 e $|D'|$) foram calculadas para todos os pares de marcadores em cada cromossomo, utilizando o software SnppldHD. Para a estimação das medidas de LD (r^2 e $|D'|$) apenas os haplótipos maternos foram considerados.

Resultados e Discussão

Neste trabalho, um total de 445.755 (57,3%) marcadores atenderam aos critérios de filtragem e foram incluídos na análise final. Este subconjunto de marcadores cobriu 2.508,5 Mb do genoma com $4,91 \pm 2,89$ kb de espaçamento médio entre marcadores. Após a filtragem de dados, uma proporção considerável de SNPs tinha MAF abaixo de 0,20. Resultados semelhantes foram relatados por McKay et al. (2007) e Silva et al. (2010) para raças zebuínas. Os cromossomos BTA3, BTA4, BTA7, BTA12, BTA15, BTA20 e BTA25 mostraram uma maior proporção de alelos com baixa frequência (MAF<0,10). Porém, os cromossomos BTA5, BTA6, BTA8 BTA9 e BTA23 apresentaram uma menor proporção de alelos com baixa frequência (MAF< 0,10). Os SNPs foram uniformemente distribuídos entre os autossomos, uma vez que a densidade de marcadores foi semelhante para todos os autossomos, variando de 4,8 a 5,0 kb. O LD médio para os autossomos variou de 0,03 a 0,20 para r^2 , e de 0,30 a 0,54 para $|D'|$. Trabalhando com bovinos da raça Gir, Silva et al. (2010) obtiveram valores de LD levemente superiores aos obtidos no presente estudo, os quais variaram de 0,17 a 0,24 e de 0,60 a 0,72, para r^2 e $|D'|$, respectivamente. Para analisar o decréscimo no LD com a distância física entre os marcadores, pares de SNP sintéticos foram classificados em intervalos (*bins*) com base na distância entre marcadores. Os valores médios de r^2 e $|D'|$ foram estimados para cada *bin* por autossomo. O LD diminuiu com o aumento da distância entre os marcadores (Tabela 1). Em contraste, as mudanças de $|D'|$ seguiram um padrão menos acentuado de declínio do LD. Níveis moderados de r^2 (entre 0,20 e 0,32) foram observados para distâncias entre marcadores inferiores a 30 kb. Quando a distância aumentou de 30 até 100 kb, o r^2 médio diminuiu de 0,20 para 0,13. Marcadores com LD (r^2) maiores que 0,30 e 0,15 estavam espaçados, em



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

média, a 40 e 43 kb, respectivamente. Ao considerar distâncias entre marcadores inferiores a 40 kb, a proporção de marcadores com r^2 superior a 0,15 e 0,30 variou de 36 a 57% e de 22 a 42%, respectivamente. Esta proporção foi inferior à relatada por Sargolzaei et al. (2008) (68,34%), que genotiparam 821 touros com 5.564 SNPs, utilizando o mesmo limiar (0,30) para LD (r^2).

Tabela 1. Desequilíbrio de ligação (r^2 e $|D'|$) entre pares (N) de SNPs sintéticos para várias distâncias considerando todos os autossomos.

Distância (kb)	N	Média $r^2 \pm$ SD	Mediana r^2	Média $ D' \pm$ SD ¹	Mediana $ D' $	% $r^2 > 0.3$ ¹	% $r^2 > 0.15$ ¹	% $ D' > 0.8$ ¹
0 - 1	53.054	0,32±0,31	0,21	0,67±0,30	0,79	42	57	34
1 - 2	97.050	0,31±0,31	0,19	0,65±0,30	0,77	40	55	32
2 - 3	102.004	0,30±0,30	0,18	0,64±0,30	0,75	38	54	31
3 - 4	110.173	0,29±0,30	0,17	0,63±0,30	0,74	37	53	30
4 - 5	106.228	0,28±0,29	0,16	0,62±0,31	0,72	36	52	29
5 - 10	502.446	0,26±0,28	0,14	0,60±0,30	0,68	33	48	27
10 - 20	957.906	0,23±0,26	0,11	0,56±0,30	0,61	28	44	24
20 - 30	927.932	0,20±0,25	0,09	0,53±0,30	0,56	24	39	21
30 - 40	911.974	0,18±0,23	0,08	0,51±0,30	0,52	22	36	19
40 - 50	905.222	0,17±0,22	0,07	0,50±0,30	0,49	20	34	18
50 - 60	896.037	0,16±0,21	0,06	0,48±0,30	0,47	18	32	17
60 - 70	889.718	0,15±0,20	0,06	0,47±0,30	0,46	16	30	16
70 - 80	885.807	0,14±0,20	0,06	0,47±0,30	0,44	15	29	15
80 - 90	883.645	0,13±0,19	0,05	0,46±0,29	0,43	14	27	14
90 - 100	881.324	0,13±0,19	0,05	0,45±0,29	0,42	13	26	14

Percentagem de pares de SNPs com $r^2 > 0,3$; $r^2 > 0,15$ e $|D'| > 0,8$

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as estratégias de mapeamento explorando LD podem ser particularmente eficazes em zebuínos. A informação de desequilíbrio de ligação estimado para marcadores espaçados até 30 kb indica que a utilização do HD Bovine SNP BeadChip para a predição dos valores genéticos dos animais apresenta-se como uma ferramenta viável na raça Nelore.

Literatura citada

- CALUS, M. P. L.; ROOS, S. P. W.; VEERKAMP, R. F. Estimating genomic breeding values from the QTL-MAS workshop data using a single SNP and haplotype/IBD approach. **BMC Proceedings**, v.3, S01-S10, 2009.
- HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetics Research**, v.38, p.209-216, 1981.
- SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S.; JANSEN, G. B.; SCHAEFFER, L. R. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. **Journal of Dairy Science** 91, 2106–17, 2008.
- SILVA, C. R.; NEVES, H. H. R.; QUEIROZ, S. A.; SENA, J. A. D.; PIMENTEL, E. C. G. Extent of linkage disequilibrium in Brazilian Gyr dairy cattle based on genotypes of AI sires for dense SNP markers. In: **9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 2010, Leipzig, Alemanha. Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2010.
- McKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; MURDOCH, B.M.; MATUKUMALLI, L.K.; AERTS, J.; WOUTER COPPIETERS, W.; CREWS, D.; DIAS NETO, E.; GILL, C.A.; GAO, C.; MANNEN, H.; STOTHARD, P.; WANG, Z.; VAN TASSELL, C.P.; WILLIAMS, J.L.; TAYLOR, J.F.; STEPHEN S MOORE, S.S. Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. **BMC Genetics**, 8:74, 2007.