

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Caracterização do genoma do búfalo utilizando Illumina BovineHD BeadChip¹

Humberto Tonhati², Rusbel Raul Aspilcueta Borquis³, Daniel Jordan Santos de Abreu³, Gregório M. F. de Camargo³, Ana Cláudia de Freitas³, Fernando Baldi⁴

¹Trabalho financiado pela FAPESP, processo: 2010/20887-1.

²Professor Titular da FCAV/Unesp- Jaboticabal email: tohnati@fcav.unesp.br

³Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV, Jaboticabal, SP.

⁴Professor Assistente Doutor da FCAV/Unesp-Jaboticabal

Resumo: Para definir as melhores estratégias de associações e seleção genômicas é fundamental conhecer o desequilíbrio de ligação (LD) e a estrutura genética presente na população de indivíduos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a transferência das informações genômicas de bovinos para bubalinos obtidas no BeadChip BovineHD Illumina. Foi coletado folículo piloso de 384 búfalos (*Bubalus bubalis*), nascidas entre 2007 e 2008 e pertencentes às fazendas Tapuio e Santa Eliza, localizadas nos estados do Rio Grande do Norte e São Paulo, respectivamente. Estas fazendas têm como principal atividade a produção de leite e conseqüente fabricação de queijos. A genotipagem foi realizada com o Bovine HD BeadChip utilizando o kit Infinium HD Assay Illumina e o Aparelho HiScan da Illumina®. Inicialmente 688.593 SNPs foram genotipados. Depois de se filtrar os dados, o número de alelos com marcadores fixos foi de 26.042 SNPs. Houve grande número de marcadores com menor frequência do alelo menor que 0,05 (645.971 SNPs), não incluindo alelos fixos. A taxa variou de 54 a 90% (média de 85%). Um total de 16.580 SNPs polimórficos foi identificado, distribuídos uniformemente por todos os autossomos, já que a densidade e a distância média entre os marcadores foram semelhantes. A frequência de alelos menores (MAF) média para o 16580 SNPs foi de 0,23. Os resultados indicam que estas informações permitem estudos de associação e seleção genômica.

Palavras chaves: autossomos, *Bubalus bubalis*, genotipagem

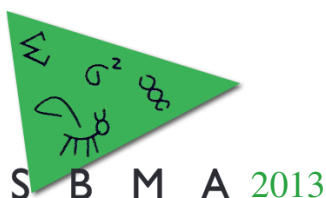
Buffalo genome characterization using Illumina BovineHD BeadChip

Abstract: In order to define better association strategies and genomic selection is fundamental to know the linkage disequilibrium (LD) and the genetic structure of the population. The aim of the study was to evaluate the transferability of the cattle genomic information to buffaloes using the BeadChip BovineHD Illumina. The tail hair of 384 buffaloes were collected and they were from two farms: Tapuio and Santa Eliza located in Rio Grande do Norte and São Paulo states, respectively. These dairy farms have as the aim activity the cheese production. The genotyping was done with Bovine HD BeadChip using the kit Infinium HD Assay Illumina and the HiScan da Illumina®. Initially 688,593 SNPs were genotyped. After checking the quality of SNPs, the number of fixed alleles was 26,042. There was a big number of alleles with frequencies lower than 0.05 (645,971 SNPs). The tax varied from 54% to 90% (mean of 85%). A total of 16,580 polymorphic SNPs was identified, uniformly distributed for all the autosome chromosomes, the density and the mean distance among the markers were similar. The mean minor allelic frequency for the 16,580 SNPs was 0.23. The results indicate that these information permit association studies and genomic selection.

Keywords: autosome, *Bubalus bubalis*, genotyping

Introdução

Os bovinos e os búfalos (*Bubalus bubalis*) pertencem à subfamília *Bovinae* e foram domesticados entre 5.000 e 10.000 anos atrás (Bradley & Cunningham, 1998 e Bibi & Vrba, 2010). Os bovinos apresentam um grande número de polimorfismos de base única (SNPs) no seu genoma. A atual base da NCBI que arquiva a dbSNP contém mais de 9,5 milhões de SNPs bovinos, entretanto existe escassa informação sobre os SNPs, identificados para os bubalinos (Amaral et al., 2008 e Michelizzi et al., 2010, 2011). Como os búfalos e os bovinos estão altamente relacionados, a grande quantidade de recursos genéticos e genômicos desenvolvidos para os bovinos podem auxiliar na caracterização do



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

genoma dos bubalinos, bem como implementar estudos de seleção genômica. O principal objetivo deste estudo foi testar e avaliar a possibilidade de transferir a informação genômica obtida a partir da Illumina BovineHD BeadChip (Illumina Inc., San Diego, EUA) para os bubalinos.

Material e Métodos

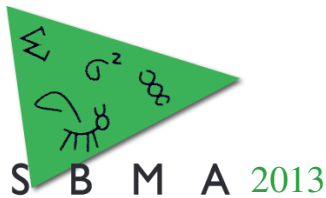
Foi coletado foliculo piloso de 384 búfalas (*Bubalus bubalis*), nascidas entre os anos 2007 e 2008 e pertencentes às fazendas Tapuio e Santa Eliza, localizadas nos estados do Rio Grande do Norte e São Paulo, respectivamente. Estas fazendas possuem como principal atividade a produção de leite e conseqüente elaboração de queijos. Todos as fêmeas estudadas possuíam informações completas de pedigree e eram filhas de 16 touros. As amostras de tecido foram colocadas em envelopes, identificadas e armazenadas a 4 °C até a extração de DNA. Depois da extração de DNA foi feito a genotipagem, realizada com o Bovine HD BeadChip utilizando o kit Infinium HD Assay Illumina e o Aparelho HiScan da Illumina®. O Bovine HD BeadChip possui 777.962 marcadores do tipo SNP espalhados pelo genoma com uma distância média entre de marcadores de 3,43 kb. As análises iniciais das imagens e dos genótipos foram realizadas utilizando o software Genome Studio (Illumina®). Um total de 1.735 marcadores foi excluído devido à posição genômica desconhecida. Apenas marcadores com Call Frequency maiores a 80% e excesso de heterozigotos (Het Excess) menores e maiores a -0,70 e 0,70, respectivamente foram considerados. Os marcadores que apresentaram baixa intensidade média do cluster (AB_R, AA_R ou BB_R mean < 0,1; AB_T_mean < 0.2 e AB_T_Mean > 0.8), escore do Gentrain < 0,30 e índice de separação dos Cluster < 0.13 foram excluídos da análise. Aplicando estes critérios foi eliminado um total de 89.369 marcadores. Critérios semelhantes para a filtragem de dados genômicos foram implementados por Michelizzi et al. (2011), utilizando o Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA). No presente estudo, apenas marcadores em cromossomos autossômicos com frequências de alelos menores (MAF) maiores a 0,05 foram incluídas nas análises.

Resultados e Discussão

Entre 688.593 SNPs bovinos que foram genotipados com sucesso nas 384 amostras de búfalo, apenas 16.580 marcadores foram polimórficos e apresentaram frequência do alelo menor superiores a 0,05, e, portanto, poderiam ser utilizados em estudos de associação e seleção genômica. Após a filtragem dos dados, o número de marcadores com alelos fixados foi 26.042 SNPs. Uma quantidade considerável de marcadores foi excluída com frequência de alelo menor inferior a 0,05 (645.971 SNPs), mas que não tinham seus alelos fixados. O Call Rate ou taxa de chamada de SNPs por amostra, que indica a qualidade da genotipagem para cada amostra, variou de 54 a 90% com média igual a 85%. Normalmente, com amostras de bovinos, esperam-se taxas de chamadas sempre superiores a 98%. Provavelmente a razão da baixa taxa de chamada (Call rate) obtidas no presente estudo pode ser um indicativo que alguns animais têm diferenças na hibridação das amostras com os primers, e, portanto, possíveis problemas de amplificação dos marcadores. Os SNPs foram uniformemente distribuídos entre os autossomos, uma vez que a densidade e distância média entre os marcadores foram semelhantes para todos os autossomos (Tabela 1). Após a filtragem de dados SNP, uma proporção considerável de SNPs tinha MAF abaixo de 0,20. Resultados semelhantes foram relatados por Michelizzi et al. (2011) que encontraram 926 marcadores SNPs polimórficos em búfalos utilizando o painel da Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA). Estes autores relataram que 386 marcadores, do total de 926 SNPs, tinham frequências alélicas menores a 0,10, e que provavelmente são muito raros para ser utilizados em búfalos.

Tabela 1. Resumo dos marcadores SNP analisados entre marcadores sintéticos para cada autossomo (BTA).

BTA	Tamanho (Mb)	SNPs (n)	¹ Média MAF	Mínimo MAF	Máximo MAF
1	158,11	1543	0,144	0,021	0,500
2	136,30	1216	0,152	0,021	0,497



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

3	120,67	1051	0,159	0,021	0,497
4	120,44	1126	0,159	0,021	0,500
5	120,267	949	0,159	0,021	0,500
6	118,99	1195	0,139	0,021	0,500
7	111,26	982	0,160	0,021	0,497
8	112,70	969	0,161	0,021	0,500
9	104,89	1016	0,147	0,021	0,500
10	102,99	909	0,164	0,021	0,500
11	106,93	961	0,161	0,021	0,500
12	90,65	878	0,146	0,021	0,500
13	84,09	639	0,168	0,021	0,497
14	83,13	773	0,153	0,021	0,497
15	84,81	748	0,169	0,021	0,500
16	81,14	736	0,161	0,021	0,500
17	74,99	656	0,149	0,021	0,495
18	65,25	541	0,182	0,021	0,500
19	62,90	472	0,172	0,021	0,500
20	71,54	717	0,163	0,021	0,500
21	68,87	661	0,157	0,021	0,500
22	61,05	512	0,193	0,021	0,500
23	51,32	446	0,176	0,021	0,500
24	62,05	568	0,173	0,021	0,497
25	42,42	408	0,189	0,021	0,497
26	50,44	453	0,148	0,021	0,492
27	45,11	452	0,169	0,021	0,497
28	46,13	441	0,160	0,021	0,495
29	49,94	463	0,154	0,021	0,500

¹Distância em Mb entre SNP adjacentes SNP: polimorfismo de base única. MAF: frequência de alelos menores.

Conclusões

O Bovina HD BeadChip contém aproximadamente 16.580 marcadores polimórficos para os bubalinos (*Bubalus bubalis*) os quais estão distribuídos uniformemente no seu genoma e podem ser utilizados em estudos de associação e seleção genômica. O desenvolvimento de um painel de marcadores SNP específicos para os búfalos é necessário para se conhecer a exata localização dos SNPs.

Literatura citada

Amaral, M.E., Grant, J.R., Riggs, P.K., et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**. 9:631, 2008.

Bibi F, Vrba ES. Unraveling bovin phylogeny: accomplishments and challenges. **BMC Biology** 2010, 8(50):1-4

Bradley DG, Cunningham EP. **Genetic aspects of domestication**. In: *The Genetics of Cattle*, eds by Fries and Ruvinski. Oxon, UK: CAB International: 1998

Michelizzi, V.N., Dodson, M.V., Pan, Z., et al.. Water buffalo genome science comes of age. **International Journal of Biological Sciences**. 6: 333-349, 2010.

Michelizzi, V.N., Wu, X., Dodson, et al. A global view of 54,001 single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the Illumina BovineSNP50 BeadChip and their transferability to water buffalo. **International Journal of Biological Sciences**. 7: 18-27, 2011.