

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA E
PRECOCIDADE SEXUAL EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE**

**Inaê Cristina Regatieri
Zootecnista**

2013

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA E
PRECOCIDADE SEXUAL EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE**

Inaê Cristina Regatieri

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque

Co-orientadora: Profa. Dra. Arione Augusti Boligon

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

2013

Regatieri, Inae Cristina
R333a Associação entre polimorfismos de base única e precocidade
sexual em fêmeas da raça Nelore / Inae Cristina Regatieri. --
Jaboticabal, 2013
v, 47 p. : il. ; 29 cm

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

1. Associação genômica. 2. Desequilíbrio de ligação. 3. Idade ao
primeiro parto. 3. Ocorrência de prenhez. 4. *Quantitative trait loci*. 5.
Bovinos de corte. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: iregatieri@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Inaê Cristina Regatieri, nascida em Tanabi - SP, no dia 29 de abril de 1988, filha de Edson Regatieri e Fátima Aparecida Menegasso. Zootecnista formada pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal. Durante a graduação, foi bolsista PIBITI e FAPESP, sob orientação da Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque. Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da mesma faculdade, como bolsista FAPESP, sob orientação da Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque.

“Olhes para trás,
mas vá em frente...
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”

Albert Einstein

“O corpo humano é a carruagem.
Eu, o homem que a conduz.
O pensamento, as rédeas.
Os sentimentos, os cavalos.”

Platão

DEDICATÓRIA

A Deus que me capacitou e permitiu mais uma realização em minha vida. Pela oportunidade e privilégio que me foram dados por Ele em cursar esta faculdade e passar por experiências inimagináveis. Por sempre estar presente ao meu lado.

À minha mãe Fátima que sempre se dedicou ao máximo para que todos meus sonhos se tornassem realidade, passou por momentos de solidão e pôde compreender minha ausência, sempre me apoiando, incentivando e não deixando que o cansaço e a saudade me impedissem de seguir em frente. Amo você mais do que tudo nesse mundo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Lucia Galvão de Albuquerque pela confiança, credibilidade e apoio na realização de todos os trabalhos.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Arione Augusti Boligon pela paciência e ensinamentos que me foram dados, além da inestimável amizade.

Ao Prof. Dr.^o Fernando Baldi pela constante disposição, paciência e todo conhecimento concedido.

A toda minha família que sempre me acolheu e me deu forças para seguir em frente e alcançar meus objetivos.

À Franciele Faxina que, inúmeras vezes, me ouviu, me incentivou e me orientou, fazendo com que as dificuldades fossem vencidas de uma forma calma e natural. Te amo.

Aos amigos Aline, Ana Fabrícia, Ana Paula, Daniel, Luciana, Marcos, Rafael Espigolan, Rafael Tonussi, Raphael Costa e todos os outros colegas de departamento, pela amizade e carinho durante todos estes anos juntos que fizeram com que esse momento em nossas vidas fosse mais do que especial e totalmente inesquecível.

À Deus que sempre me atendeu em minhas preces e nunca me abandonou.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e institucional, que possibilitou a execução deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Revisão de literatura	2
1.1 Características indicadoras de precocidade sexual em fêmeas	2
1.2 Associações entre marcadores e características	5
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. Referências	9
CAPÍTULO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA E PRECOCIDADE SEXUAL EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. Introdução	17
2. Materiais e métodos	19
2.1 Consistências dos dados	20
2.2 Desequilíbrio de ligação	22
2.3 Análises de associação	23
2.4 Regiões de QTL	24
3. Resultados e discussão	24
3.1 Desequilíbrio de ligação	24
3.2 Estudos de Associação	30
4. Conclusões	40
5. Referências	41

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA E PRECOCIDADE SEXUAL EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE

RESUMO - As características reprodutivas estão relacionadas à eficiência econômica e à produtividade dos sistemas de criação de bovinos. A idade ao primeiro parto (IPP) e a ocorrência de prenhez precoce (OP) são empregadas em sistemas de melhoramento genético com a finalidade de antecipar a vida reprodutiva dos animais. A medida (r^2) de desequilíbrio de ligação (LD) é empregada em estudos de associação genômica, para detecção de marcadores genéticos e genes que influenciam características quantitativas (*quantitative trait loci*: QTL). O objetivo deste estudo foi determinar o grau de desequilíbrio de ligação no genoma de fêmeas da raça Nelore e verificar a existência de associações entre polimorfismos de base única (SNP) e as características IPP e OP, utilizando um painel de SNPs de alta densidade. Foram utilizadas 1.182 fêmeas da raça Nelore nascidas em 2007 e 2008, pertencentes à Agropecuária Jacarezinho LTDA. Foram formados 13 grupos de contemporâneas (GC) constituídos por fazenda, estação e ano de nascimento, com média de 90 animais por grupo. Para o estudo de associação genômica, foram excluídos SNPs que apresentaram frequência do alelo menor (MAF) inferior a 0,05 e animais com Call Rate menor que 0,90, totalizando 431.885 SNPs. Para as análises estatísticas, foi utilizado um modelo linear para IPP e um modelo de limiar para OP. Para a estimativa da significância das associações, em ambas as características, o modelo incluiu como efeitos fixos classificatórios, o GC e os SNPs. Para estimativa do efeito de substituição alélica, foi utilizado o mesmo modelo considerando os SNPs como covariável. A correção de Bonferroni foi aplicada para ajustar o limite de significância ($1,16 \times 10^{-7}$). A média de LD (r^2) para todos os autossomos foi de 0,18, a uma distância média de 4,8 kb, e a média da MAF foi de $0,25 \pm 0,13$. O LD diminuiu com o aumento da distância entre os marcadores. Níveis moderados de r^2 (0,21 a 0,35) foram encontrados a distâncias menores que 30 kb e menores níveis (0,12 a 0,18) foram observados de 30 a 100 kb. Foram detectadas onze associações significativas em sete cromossomos diferentes (BTA1, BTA4, BTA6, BTA11, BTA17, BTA21, BTA22). Destes, sete SNPs estavam associados à IPP e quatro estavam ligados à OP. Três SNPs foram significativos para ambas as características (BTA1, BTA21, BTA22). O cromossomo BTA21 apresentou dois SNPs relacionados à ocorrência de prenhez precoce. Dezenove cromossomos demonstraram potenciais regiões de QTL para IPP e OP. Os picos de SNPs significativos mais evidentes, que podem sugerir potenciais regiões de QTL, estavam localizados nos cromossomos BTA4, BTA6, BTA8, BTA17 e BTA19. A identificação de SNPs associados às características IPP e OP pode contribuir para seleção de animais com maior precocidade sexual.

Palavras-chave: associação genômica, bovinos de corte, desequilíbrio de ligação, idade ao primeiro parto, ocorrência de prenhez, *quantitative trait loci*

ASSOCIATION BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AND SEXUAL PRECOCITY IN NELLORE HEIFERS

ABSTRACT - Reproductive traits are related to economic efficiency and productivity of cattle systems. Age at first calving (AFC) and occurrence of early pregnancy (OP) are used in beef breeding programs in order to anticipate the reproductive life. The measure (r^2) of linkage disequilibrium (LD) is used in genome wide association studies to detect genetic markers and genes affecting quantitative traits (QTL). The aim of this study was to determine the extent of LD in the genome of Nelore cattle, and examine associations between single nucleotide polymorphisms (SNP) and AFC and OP, using a panel of high-density SNPs. Data from 1.182 Nelore born in 2007 and 2008, belonging to Agropecuária Jacarezinho were used. A total of 13 contemporary groups (CG) consisting of farm, season and year of birth, with an average of 90 animals per CG were formed. For genomic-wide association, SNPs with minor allele frequency (MAF) below 0.05, and animals with Call Rate below 0.90 were excluded, totaling 431,885 SNPs. For the statistics analyses, a linear model was used for IPP and a threshold model was used for OP. To estimate the significance of the associations, for both traits, the model included the classificatory fixed effects of GC and SNPs (0,1, and 2). To estimate the allelic substitution effect, the same model was used, considering the SNP effects as covariable. The Bonferroni correction was applied to adjust the limit of significance (1.16×10^{-7}). The average r^2 for all autosomes was 0.18 at a distance of 4.8 kb and the average MAF was 0.25 ± 0.13 . The LD decreased as the distance between markers increased: 0.35 (1 kb) to 0.12 (100 kb). Eleven significant associations were detected in seven different chromosomes (BTA1, BTA4, BTA6, BTA11, BTA17, BTA21, and BTA22). Among these, seven SNPs were associated with AFC and four were linked to the OP. Three SNPs were significant for both traits (BTA1, BTA21, and BTA22). Chromosome BTA21 showed two SNPs associated with OP. A total of 19 chromosomes showed potential QTL regions for AFC and OP. The most evident peaks of significant SNPs, that may suggest potential QTL regions, were located on chromosomes BTA4, BTA6, BTA8, BTA17, and BTA19. The identification of SNPs associated with AFC and OP may contribute to selection of animals with greater sexual precocity.

Keywords: genomic wide association, beef cattle, linkage disequilibrium, age at first calving, heifer pregnancy, *quantitative trait loci*

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Número de SNPs eliminados (N) de acordo com os critérios de exclusão no controle de qualidade da genotipagem pelo BovineHD BeadChip21
- TABELA 2** - Descrição estatística dos dados por cromossomo.....25
- TABELA 3** - Medidas de desequilíbrio de ligação (r^2) por intervalos de distâncias...29
- TABELA 4** - Número de SNPs (N) significativos, média dos p-valores (entre parênteses) e taxa de falso positivo (FDR), em três níveis de significância (α).31
- TABELA 5** - SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).37
- TABELA 6** - Frequências genóticas e alélicas dos SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).....37
- TABELA 7** - Genes mais próximos aos SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).38
- TABELA 8** - Efeito de substituição alélica (alelo A para alelo B) dos SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).40

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Proporção de SNPs de acordo com classes de MAF, nos cromossomos bovinos (BTA) 1 ao 29.....27
- FIGURA 2** - Desequilíbrio de ligação médio (r^2) em função da distância entre marcadores, nos cromossomos bovinos (BTA) 1 ao 29.....28
- FIGURA 3** - Gráfico Q-Q comparando valores observados e esperados de $-\log_{10}$ (p-valores) para idade ao primeiro parto.....30
- FIGURA 4** - Gráfico Q-Q comparando valores observados e esperados de $-\log_{10}$ (p-valores) para ocorrência de prenhez precoce.31
- FIGURA 5** - Gráfico Manhattan para idade ao primeiro parto. O $-\log_{10}$ (p-valores) está plotado em função dos SNPs de cada cromossomo.....34
- FIGURA 6** - Gráfico Manhattan para ocorrência de prenhez precoce. O $-\log_{10}$ (p-valore) está plotado em função dos SNPs de cada cromossomo35

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

As características reprodutivas são as principais determinantes da eficiência biológica e econômica dos sistemas de produção de carne bovina. Segundo Barwick et al. (1995), do ponto de vista econômico, na bovinocultura de corte, a eficiência reprodutiva é a característica mais importante, seguida das características de crescimento e, por último, das características de carcaça. Rebanhos que possuem altas taxas reprodutivas e elevada precocidade sexual terão menores custos de produção e maior lucratividade (TOELLE E ROBISON, 1985).

As características reprodutivas são pouco utilizadas nos programas de melhoramento genético no Brasil, apesar de sua importância para os sistemas de produção. As baixas herdabilidades estimadas para essas características indicam que as diferenças ambientais são as principais causas de variação genética (PEREIRA et al., 2000; SILVEIRA et al., 2004), sendo provavelmente, um dos motivos para que essas características não sejam amplamente incluídas nos índices de seleção. Algumas das características mais empregadas em programas de melhoramento genético são o perímetro escrotal, considerado em praticamente todos os programas de avaliação genética de gado de corte, e as características reprodutivas idade ao primeiro parto, habilidade de permanência e ocorrência de prenhez precoce em novilhas (DOYLE et al., 2000; MERCADANTE et al., 2000; PEREIRA et al., 2000; GARNERO et al., 2001; SILVA et al., 2003).

No país, são escassas as alternativas tecnológicas para melhorar a precocidade sexual do rebanho utilizando os métodos clássicos de melhoramento genético animal. Nos últimos anos, após o sequenciamento do genoma humano e de várias espécies de animais domésticos, uma quantidade significativa de trabalhos sobre a aplicação de dados genômicos em diversas áreas vêm sendo publicados. Com o aperfeiçoamento das tecnologias genômicas, assim como a utilização de painéis de polimorfismos de base única (SNP), se tornou possível a identificação e o estudo de marcadores e genes que controlam a variação de características de interesse econômico de baixa herdabilidade e/ou difíceis de mensurar, como é o caso das características reprodutivas.

1. Revisão de literatura

1.1 Características indicadoras de precocidade sexual em fêmeas

A antecipação da vida reprodutiva das fêmeas está ligada ao lucro e à eficiência de produção de carne bovina. Beretta et al. (2001) indicaram as vantagens de diminuir a idade ao primeiro parto (IPP) das fêmeas. Os autores verificaram que ao reduzir a IPP, a produtividade do sistema de cria (quilos de bezerro desmamado/ha) aumenta, porém a magnitude da resposta era dependente da taxa de natalidade do rebanho. A redução da IPP de quatro para três anos e, de três para dois anos, levou a um aumento dos quilos de bezerros desmamados/hectare de 53,5 e 14,3%, respectivamente, com 60 a 70% de natalidade. Esta mudança permitiu a redução das categorias improdutivas, com consequente liberação de áreas para as fêmeas em reprodução e diminuição do custo energético por unidade de produto.

A IPP é uma característica que vem sendo utilizada como indicadora de precocidade sexual de fêmeas por ser observada cedo, sendo facilmente obtida (DIAS et al., 2004a). Entretanto, selecionar diretamente para menor IPP não é simples, pois alguns produtores atrasam a entrada das fêmeas na reprodução, determinando idade ou peso para início da vida reprodutiva, o que dificulta a identificação das fêmeas sexualmente precoces. Além disso, esta característica, geralmente, apresenta estimativas de herdabilidade de magnitudes baixas a moderadas (0,09 a 0,28) (MERCADANTE et al., 2000; PEREIRA et al., 2000; DIAS et al., 2004a; BOLIGON et al., 2010), indicando que a resposta à seleção para idade ao primeiro parto pode ser lenta. Buzanskas et al. (2010), analisando idade ao primeiro parto em animais da raça Canchim, relataram baixa herdabilidade (0,03) para a característica. Mesmo assim, os autores sugeriram a inclusão da mesma nos critérios de seleção a fim de melhorar as taxas de concepção, devido à sua importância econômica. Estimando herdabilidade para idade ao primeiro parto em fêmeas da raça Nelore, Boligon et al. (2011) e Yokoo et al. (2012) relataram estimativas de 0,10 e 0,26, respectivamente. Esses valores indicam que a característica é altamente influenciável por fatores ambientais e seu ganho genético pode ser pequeno quando praticada a seleção.

Uma das formas de aumentar a resposta à seleção é expor as fêmeas à reprodução com idade mais jovem. Pereira et al. (2002) compararam fêmeas da raça Nelore expostas à reprodução pela primeira vez aos 14 e 26 meses de idade. Os autores estimaram maior coeficiente de herdabilidade (0,19) para a característica após exposição aos 14 meses de idade, o que indica que a utilização da idade ao primeiro parto como critério de seleção pode gerar uma resposta mais eficiente em populações de animais nas quais as fêmeas entram em estação de monta com idade mais jovem (14 meses). Dias et al. (2004b) estudaram o efeito da idade de exposição de novilhas à reprodução por meio de quatro conjunto de informações : 1) novilhas expostas aos 24 meses de idade; 2) novilhas com informação de primeiro parto, independente da idade de exposição; 3) novilhas expostas aos 18 meses de idade; 4) todas as novilhas nascidas no rebanho, incluindo as não paridas. As estimativas de herdabilidade encontradas para os quatro grupos, respectivamente, foram: 0,00; 0,11; 0,20 e 0,36. Segundo os autores, a exposição de fêmeas à reprodução em idade mais jovem aumenta a variabilidade genética e as estimativas de herdabilidade, levando a um conseqüente aumento da resposta à seleção.

As baixas estimativas de herdabilidade obtidas para idade ao primeiro podem ser explicadas, em geral, pelo fato de as fêmeas serem expostas à reprodução em idade pré-determinada e durante um curto período de tempo referente à estação de monta. Além disto, apenas os animais que parem são incluídos nas análises. Isso tudo faz com que a identificação de animais precoces fique prejudicada e grande parte da variabilidade genética da característica seja perdida (DIAS et al., 2004b). Outra característica que pode ser empregada, buscando evitar esses problemas, é a ocorrência de prenhez precoce, utilizada recentemente para avaliar a precocidade sexual de fêmeas, tanto de raças *Bos taurus* (EVANS et al., 1999; DOYLE et al., 2000; DONOGHUE et al., 2004), como *Bos indicus* (ELER et al., 2002; ELER et al., 2004; SILVA et al., 2005; SHIOTSUKI et al., 2009). Segundo Shiotsuki et al. (2009), a ocorrência de prenhez é definida pela observação de uma novilha que concebeu e pariu depois de ser exposta à reprodução durante a estação de monta. A característica possui resultado binário, sendo atribuído “1” (sucesso) para as novilhas que conceberam e pariram, e “0” (fracasso) para as que falharam. Sendo

assim, todas as fêmeas são incluídas nas análises sem precisar utilizar penalidades para os animais que não pariram (Silva et al., 2005).

Dias et al. (2000) apresentaram vantagens de se usar a ocorrência de prenhez como indicadora de precocidade sexual, em vez da idade ao primeiro parto: a obtenção de registros de dados de prenhez de novilha não tem custos adicionais, pois são normalmente controlados por criadores que participam de programas de seleção; os métodos de diagnóstico de prenhez já estão bem estabelecidos (palpação retal ou ultra-som, por exemplo). Além disso, segundo Silva et al. (2005), esta característica é de fácil mensuração, pode ser medida diretamente na fêmea e em todas as contemporâneas e não há necessidade de utilização de penalidades. Entretanto, existem algumas dificuldades, principalmente quanto ao fato de ser uma característica categórica e, conseqüentemente, necessitar de procedimentos estatísticos que considerem a distribuição discreta dos dados.

Em várias pesquisas tem-se observado que a OP pode responder rapidamente à seleção devido aos altos valores de herdabilidade encontrados, variando de 0,50 a 0,73, para ocorrência de prenhez de novilhas expostas pela primeira vez entre os 14 e 18 meses de idade (ELER et al., 2002; ELER et al., 2004; SILVA et al., 2005; SHIOTSUKI et al., 2009; VAN MELIS et al., 2010; BOLIGON et al., 2011). Van Melis et al. (2010), avaliando fêmeas da raça Nelore, expostas à reprodução aos 14 meses de idade, relataram uma estimativa de herdabilidade alta (0,53) e, além disso, estimaram alta correlação genética (0,64) entre esta característica e a habilidade de permanência das fêmeas no rebanho. Os autores concluíram que a diferença esperada na progênie (DEP) para ocorrência de prenhez pode ser usada para selecionar touros visando à produção de progênies precoces e férteis.

Em bovinos de corte da raça Nelore, estudos envolvendo acasalamento aos 14 meses de idade indicam taxa de prenhez média de 15,4 a 18,2% (ELER et al., 2002; ELER et al., 2004; ELER et al., 2006). Silva et al. (2005) compararam a variabilidade genética para ocorrência de prenhez em novilhas utilizando dois grupos de animais, um que entrou em estação de monta antecipada ao redor dos 16 meses de idade (Pr16) e outro que incluiu, além destas, fêmeas que foram expostas na estação normal aos 24 meses (Pr24). As estimativas de herdabilidade obtidas para

Pr16 e Pr24 foram 0,52 e 0,12, respectivamente. Segundo os autores, a estimativa de herdabilidade aos 16 meses foi maior devido à grande variabilidade genética existente nesta idade com relação à capacidade de concepção. Sendo assim, é evidente que expor as fêmeas para reprodução em idades mais jovens é fundamental para que a característica responda eficientemente à seleção.

1.2 Associações entre marcadores e características

Nas últimas décadas, foram identificados vários genes que afetam ou influenciam a expressão de características de importância econômica, os chamados QTL (*quantitative trait loci*), que explicam uma determinada fração da variação fenotípica da característica (ANDERSON, 2001). Até março de 2013, foram identificados 6.305 QTL em bovinos, sendo que desses, 1.333 influenciam a reprodução, 1.364 afetam a qualidade da carne, 1.731 influenciam a qualidade e produção do leite, entre outros (Hu et al., 2013).

Para viabilizar a identificação e o mapeamento de QTL é utilizado o desequilíbrio de ligação (LD). Segundo Nsengimana et al. (2004), LD em uma população é uma associação não aleatória de alelos em diferentes loci genéticos e suas medidas podem fornecer informações da estrutura e dinâmica da população, além de ser utilizado para mapear genes ou QTL. As medidas mais comumente utilizadas para avaliar o LD são o r^2 e o $|D'|$ (LEWONTIN, 1964; HILL e ROBERTSON, 1968). Essas medidas podem variar de 0 a 1. O quadrado das correlações entre as frequências alélicas dos loci (r^2) é dito ser mais apropriado pelo fato de apresentar melhores propriedades estatísticas e facilidade de interpretação (HAYES, 2009). Além disso, a medida $|D'|$ possui como desvantagem uma tendência de ser superestimada em pequenas amostras.

Existem vários tipos de marcadores moleculares, sendo que, atualmente, os polimorfismos de base única (SNP), estão sendo os mais utilizados para a detecção e localização de QTL para características complexas (HAYES et al., 2008), por serem a forma de variação mais abundante de polimorfismos de DNA em todo o genoma, além de serem de fácil genotipagem. Nesse contexto, empresas que desenvolvem tecnologias para análises genéticas produziram, inicialmente, chips de

DNA de baixas densidades, permitindo avanços nos estudos direcionados para identificação de genes que controlam características de interesse econômico. Há alguns anos, a empresa Illumina Incorporation liberou a comercialização de chips de maiores densidades, como o Illumina Infinium® BovineSNP50 BeadChip que contém, aproximadamente, 54.000 SNPs espalhados pelo genoma bovino, com um espaçamento médio entre marcadores de 51,5 Kb (VAN TASSELL et al., 2008). Posteriormente, a Illumina juntamente com o Departamento de Agricultura dos EUA - Serviço de Pesquisa Agrícola (USDA-ARS), Pfizer Animal Genetics, Universidade do Missouri, Associação Nacional de Cooperativas Pecuárias e Inseminação Artificial da França (UNCEIA) e Instituto Nacional Francês de Pesquisa Agrícola (INRA), lançou o BovineHD BeadChip. Esse chip de alta densidade possui 777.962 SNPs espalhados uniformemente pelo genoma bovino, com um espaçamento médio de menos de 3 kb entre marcadores, permitindo maior acurácia nas pesquisas genômicas, identificação de locos de características quantitativas, avaliação de mérito genético dos animais, estudos de desequilíbrio de ligação e associação genômica, entre outros (Illumina Inc, 2012)

O desenvolvimento desses painéis que identificam um grande número de SNPs do genoma bovino permitiu avanços significativos nos estudos de localização de genes que afetam as características de importância econômica e nas associações entre os marcadores genéticos e o fenótipo. Segundo Matukumalli et al. (2009), as regiões do genoma que influenciam a variação genética de características podem ser melhor mapeadas quando existe uma alta densidade de marcadores, permitindo assim, uma eficiente identificação de genes candidatos. De Roos et al. (2008) relataram que para encontrar marcadores que estejam em LD com QTL dentro da mesma raça seriam necessários cerca de 50.000 SNPs e entre raças divergentes, como Holstein, Jersey e Angus, seriam necessários, aproximadamente, 300.000 SNPs. A principal limitação nos estudos de associação é essa necessidade de um número suficientemente grande de marcadores para aumentar a chance de se identificar o desequilíbrio com o QTL.

Durante os últimos anos, estudos de associação genômica entre SNPs e características de importância econômica em animais domésticos, como gado, suínos, equinos, ovelhas e galinhas, foram descritos na literatura (ZHANG et al.,

2012). Muitos desses estudos foram desenvolvidos com a utilização do painel Illumina Bovine SNP50 em gado de leite e gado de corte, para características ligadas à produção de leite e gordura e à qualidade de carcaça (Mai et al., 2010; Bolormaa et al., 2011; Bouwman et al., 2011; Maxa et al., 2012).

Trabalhos recentes também empregaram o painel Illumina Bovine SNP50 para estudos de associação com características reprodutivas. Sahana et al. (2010) realizaram um estudo de associação genômica ampla com 11 características reprodutivas relatando forte associação entre SNPs e algumas características de fertilidade em fêmeas da raça Danish e Swedish Holstein. Pryce et al. (2010) estudaram a associação de SNPs e haplótipos com características de produção de leite e fertilidade em animais da raça Holstein e Jersey. Os autores encontraram SNPs significativos para concentração de proteína e de gordura. No entanto, identificaram uma região no cromossomo 18, próxima a um potencial QTL para fertilidade, apenas quando aumentaram o tamanho dos haplótipos. Schulman et al. (2011) detectaram várias regiões cromossômicas com QTL significativamente associados à características incluídas em um índice de fertilidade em bovinos da raça Finnish Ayrshire.

Em gado de corte, ainda são escassos os estudos de identificação de marcadores moleculares associados às características reprodutivas das fêmeas. Recentemente, Zhang et al. (2010), utilizando uma população de 1.007 fêmeas da raça Brahman, genotipadas com o painel Illumina Bovine SNP50 (Illumina Inc, Hayward, CA), aplicando análises de regressão simples e múltipla, detectaram associações significativas entre vários marcadores SNPs e idade à puberdade das fêmeas. Hawken et al. (2011), utilizando o mesmo painel para genotipar animais da raça Brahman e Composto Tropical, observaram associação entre SNPs e idade à puberdade, intervalo de anestro pós-parto e ocorrência de ovulação pós-parto antes do desmame. Posteriormente, Fortes et al. (2012), utilizando as mesmas fêmeas Brahman do estudo de Hawken et al. (2011), além de sua progênie, relataram a presença de SNPs e regiões cromossômicas diretamente associadas à idade à puberdade das fêmeas e à circunferência escrotal, o que deve auxiliar na seleção para precocidade sexual em raças tardias.

A utilização dos painéis de SNPs de alta densidade nos estudos de melhoramento animal permitirá ganhos genéticos significativos, sobretudo em características de difícil e/ou alto custo de mensuração e baixa herdabilidade, como é o caso das características associadas à precocidade sexual de bovinos de corte. Apesar dos grandes avanços nas técnicas de biologia molecular, os quais possibilitam a genotipagem de grande número de animais, ainda são poucos os trabalhos de pesquisa estudando a associação ampla dos SNPs e características indicadoras de precocidade sexual no Zebu. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi identificar e estudar marcadores genéticos para as características reprodutivas de importância econômica, em bovinos da raça Nelore, e fornecer informações sobre a associação entre o genótipo e o fenótipo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar o grau de desequilíbrio de ligação no genoma de bovinos da raça Nelore utilizando um painel de SNPs de alta densidade para, subsequentemente, verificar a presença de marcadores genéticos e sua associação com as características idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a distribuição de frequências dos polimorfismos e análise de desequilíbrio de ligação no genoma de bovinos da raça Nelore
- Estudar a associação de polimorfismos do tipo SNP com as características de precocidade sexual no genoma bovino
- Estimar os efeitos dos SNPs sobre as características idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce

3. Referências

- ANDERSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Natural Review Genetics**, v.2, p.130-138, 2001.
- BARWICK, S.A.; HENZELL, A.L.; GODDARD, M.E. Beef breeding for cow fertility: when is it important? *Proceedings Australian Association Animal Breeding Genetics*, **Proceedings...** v.11, p.443-446, 1995.
- BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ, C.G.A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas pecuários criadores diferindo na idade das novilhas ao primeiro parto e na taxa de natalidade do rebanho de cria no Rio Grande de Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1278-1288, 2001.
- BOLIGON, A.A.; ALBUQUERQUE, L.G.; MERCADANTE, M.E.Z.; LOBO, R.B. Study to relations between age at first calving, average weight gains and weights from weaning to maturity in Nelore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.746-751, 2010.
- BOLIGON, A.A.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Production Science**, v.141, p.12-16, 2011.
- BOLORMAA, S.; PORTO NETO, L.R.; ZHANG, Y.D.; BUNCH, R.J.; HARRISON, B.E.; GODDARD, M.E.; BARENDSE, W. A genome-wide association study of meat and carcass traits in Australian cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2297-2309, 2011.
- BOUWMAN, A.C.; BOVENHUIS, H.; VISKER, M.H.; VAN ARENDONK, J.A. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. **BMC Genetics**, v.12, p.1471-2156, 2011.
- BUZANSKAS, M.E.; GROSSI, D.A.; BALDI, F.; BARROZO, D.; SILVA, L.O.C.; TORRES JÚNIOR, R.A.A.; MUNARI, D.P.; ALENCAR, M.M. Genetic associations between stayability and reproductive and growth traits in Canchim beef cattle. **Livestock Science**, v.132, p.107-112, 2010.

DE ROOS, A.P.W.; HAYES, B.J.; SPELMAN, R.J.; GODDARD, M.E. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. **Genetics**, v.179, p.1503-1512, 2008.

DIAS, F.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S.; SILVA, J.A.V. Melhoramento genético da precocidade sexual na raça Nelore. **II Simpósio de Produção de Gado de Corte**, Viçosa - MG, 2000.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. Estimativas de herdabilidade para idade ao primeiro parto na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.97-102, 2004a.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. Efeito da idade de exposição de novilhas à reprodução sobre estimativas de herdabilidade da idade ao primeiro parto em bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.370-373, 2004b.

DONOGHUE, K.A.; REKAYA, R.; BERTRAND, J.K.; MISZTAL, I. Genetic evaluation of calving to first insemination using natural and artificial insemination mating data. **Journal of Animal Science**, v.82, p.362-367, 2004.

DOYLE, S.P.; GOLDEN, B.L.; GREEN, R.D.; BRINKS, J.S.. Additive genetic parameter estimates for heifer pregnancy and subsequent reproduction in Angus females. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2091-2098, 2000.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.II.V.; FERRAZ, J.B.S.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H.N., EVANS, J.L., GOLDEN, B.L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.951-954, 2002.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.II V.; EVANS, J.L.; FERRAZ, J.B.S.; DIAS, F.; GOLDEN B. L. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2519-2527, 2004.

ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S.; BALIEIRO, J.C.C.; MATTOS, E.C.; MOURAO, G.B. Genetic correlation between heifer pregnancy and scrotal circumference measured at 15 and 18 months of age in Nelore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.569–580, 2006.

EVANS, J.L.; GOLDEN, B.L.; BOURDON, R.M.; LONG, K.L. Additive genetic relationship between heifer pregnancy and scrotal circumference in Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2621-2628, 1999.

FORTES, M. R. S.; LEHNERT, S. A.; BOLORMAA, S.; REICH, C.; FORDYCE, G.; CORBET, N.J.; WHAN, V.; HAWKEN, R.J.; REVERTER, A. Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. **Animal Production Science**, v.52, p.143-150, 2012.

GARNERO, A.V.; LOBO, R.B.; BEZERRA, L.A.F.; OLIVEIRA, H.N. Comparação entre alguns critérios de seleção para crescimento na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.714-718, 2001.

HAYES, B.J.; LIEN, S.; NILSEN, H.; OLSEN, H.G.; BERG, P.; MACEACHERN, S.; POTTER, S.; MEUWISWSEN, T.E. The origin of selection signatures on bovine chromosome 6. **Animal Genetics**, v.39, p.105-111, 2008.

HAYES, B.J. Whole Genome Association and Genomic Selection. Jaboticabal, SP: FUNEP, 120p (Course Notes), 2009.

HAWKEN, R.J.; ZHANG, Y.D.; FORTES, M.R.S.; COLLIS, E.; BARRIS, W.C.; CORBET, N.J.; WILLIAMS, P.J.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R.G.; WALKLEY, J.R.W.; BARENDSE, W.; JOHNSTON, D.J.; PRAYAGA, K.C.; TIER, B.; REVERTER, A.; LEHNERT, S.A. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.90, p.1398-1410, 2011.

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

HU, Z.L.; PARK, C.A.; WU, X.L.; REECY, J.M. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. **Nucleic Acids Research**, v.41, D871-D879, 2013.

Illumina Inc. Disponível em: <http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf>. Acesso em: maio de 2012.

LEWONTIN, R.C. The interaction of selection and linkage: General considerations; heterotic models. **Genetics**, v.49, p.49-67, 1964.

MAI, M.D.; SAHANA, G.; CHRISTIANSEN, F.B.; GULDBRANDTSEN, B. A genome-wide association study for milk production traits in Danish Jersey cattle using a 50K single nucleotide polymorphism chip. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3522-3528, 2010.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; ALLAN, M.F.; HEATON, M.P.; O'CONNELL, J.; MOORE, S.S.; SMITH, T.P.L.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSEL, C.P. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. **PLoS ONE** 4(4): e5350. doi:10.1371/journal.pone.0005350, 2009.

MAXA, J.; NEUDITSCHKO, M.; RUSS, I.; FÖRSTER, M.; MEDUGORAC, I. Genome-wide association mapping of milk production traits in Braunvieh cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.5357-5364, 2012.

MERCADANTE, M.E.Z.; LOBO, R.B.; OLIVEIRA, H.N. Estimativas de (co)variância entre características de reprodução e de crescimento em fêmeas de um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.997-1004, 2000.

NSENGIMANA, J.; BARET, P.; HALEY, C.S.; VISSCHER, P.M. Linkage Disequilibrium in the Domesticated Pig. **Genetics**, v. 166, p.1395-1404, 2004.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1676-1683, 2000.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.703-708, 2002.

PRYCE, J.E.; BOLORMAA, S.; CHAMBERLAIN, A.J.; BOWMAN, P.J.; SAVIN, K.; GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. A validated genome-wide association study in two dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3331-3345, 2010.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; BENDIXEN, C.; LUND, M.S. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Animal Genetics**, v.41, p.579-588, 2010.

SCHULMAN N.F.; SAHANA G.; ISO-TOURU, T.; MCKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; LUND M.S.; TAYLOR, J.F.; VIRTA, J.; VIKKI, J.H. Mapping of fertility traits in Finnish Ayrshire by genome-wide association analysis. **Genetics Selection Evolution**, v.42, p.263-269, 2011.

SILVA, J.A.IV.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S.; GOLDEN, B.L.; OLIVEIRA, H.N. Heritability estimate for stayability in Nelore cows. **Livestock Production Science**, v.79, p.97-101, 2003.

SILVA, J.A.IV.; DIAS, L.T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1568-1572, 2005.

SILVEIRA J.C.; MCMANUS, C.; MASCIOLI, A.S.; SILVA, L.O.C.; SILVEIRA, A.C.; GARCIA, J.A.S.; LOUVANDINI, H. Fatores ambientais e parâmetros genéticos para características produtivas e reprodutivas em um rebanho Nelore no estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1432-1444, 2004.

SHIOTSUKI, L.; SILVA, J.A.V.; TONHATI, H.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic associations of sexual precocity with growth traits and visual scores of conformation, finishing, and muscling in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1591-1597, 2009.

TOELLE, V.D. e ROBISON, O.W. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. **Journal of Animal Science**, v.60, p.89-100, 1985.

VAN MELIS, M.H.; ELER, J.P.; ROSA, G.J.M.; FERRAZ, J.B.S.; FIGUEIREDO, L.G.G.; MATTOS, E.C.; OLIVEIRA, H.N. Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer pregnancy and stayability in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3809-3813. 2010.

VAN TASSELL, C.P.; SMITH, T.P.L.; MATUKUMALLI, L.K.; TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; LAWLEY, C.T.; HAUDENSCHILD, C.D.; MOORE, S.S.; WARREN, W.C.; SONSTEGARD, T.S. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. **Nature Methods**, v.5, p.247-252, 2008.

YOKOO, M.J.; MAGNABOSCO, C.U.; ROSA, G.J.M.; LÔBO, R.B.; ALBUQUERQUE, L.G. Características reprodutivas e suas associações com outras características de importância econômica na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.91-100, 2012.

ZHANG, Y.D.; TIER, B.; HAWKEN R.J. Whole Genome Analysis of Heifer Puberty in Brahman Cattle. In: 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, from 1 to 6 of August of 2010, Leipzig, Germany, 2010. CD-ROM.

ZHANG, H.; WANG, Z.; WANG, S.; LI, H. Progress of genome wide association study in domestic animals, **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.3, p.26-35, 2012.

CAPÍTULO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA E PRECOCIDADE SEXUAL EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE

RESUMO - Características reprodutivas como idade ao primeiro parto (IPP) e ocorrência de prenhez precoce (OP) são empregadas em programas de melhoramento genético por estarem ligadas à produtividade e lucratividade dos sistemas de criação de bovinos. A medida (r^2) de desequilíbrio de ligação (LD) é empregada em estudos de associação genômica, para detecção de marcadores genéticos e genes que afetam características quantitativas (*quantitative trait loci*: QTL). O objetivo deste estudo foi determinar o grau de desequilíbrio de ligação no genoma de fêmeas da raça Nelore e verificar a existência de associações entre polimorfismos de base única (SNP) e as características IPP e OP, utilizando um painel de SNPs de alta densidade. Foram utilizadas 1.182 fêmeas da raça Nelore nascidas em 2007 e 2008, pertencentes à Agropecuária Jacarezinho LTDA. Foram formados 13 grupos de contemporâneas (GC) constituídos por fazenda, estação e ano de nascimento, com média de 90 animais por grupo. Para o estudo de associação genômica, foram excluídos SNPs que apresentaram frequência do alelo menor (MAF) inferior a 0,05 e animais com Call Rate menor que 0,90, totalizando 431.885 SNPs. Para as análises estatísticas, foi utilizado um modelo linear para IPP e um modelo de limiar para OP. Para a estimativa da significância das associações, em ambas as características, o modelo incluiu como efeitos fixos classificatórios, o GC e os SNPs (0, 1 e 2). Para estimativa do efeito de substituição alélica, foi utilizado o mesmo modelo considerando os SNPs como covariável. A correção de Bonferroni foi aplicada para ajustar o limite de significância ($1,16 \times 10^{-7}$). A média de LD (r^2) para todos os autossomos foi de 0,18, a uma distância média de 4,8 kb, e a média da MAF foi de $0,25 \pm 0,13$. O LD diminuiu com o aumento da distância entre marcadores: de 0,35 (1 kb) para 0,12 (100 kb). Foram detectadas onze associações significativas em sete cromossomos diferentes (BTA1, BTA4, BTA6, BTA11, BTA17, BTA21, BTA22). Destes, sete SNPs estavam associados à IPP e quatro estavam ligados à OP. Três SNPs foram significativos para ambas as características (BTA1, BTA21, BTA22). O cromossomo BTA21 apresentou dois SNPs relacionados à ocorrência de prenhez precoce. Dezenove cromossomos demonstraram potenciais regiões de QTL para IPP e OP. Os picos de SNPs significativos mais evidentes, que podem sugerir potenciais regiões de QTL, estavam localizados nos cromossomos TA4, BTA6, BTA8, BTA17 e BTA19. A associação genômica, responsável pela identificação de SNPs ligados às características IPP e OP, pode contribuir para a seleção de animais sexualmente precoces.

Palavras-chave: associação genômica, bovinos de corte, desequilíbrio de ligação, idade ao primeiro parto, ocorrência de prenhez, *quantitative trait loci*

ASSOCIATION BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AND SEXUAL PRECOCITY IN NELLORE HEIFERS

ABSTRACT - Reproductive traits, such as age at first calving (AFC) and occurrence of early pregnancy (OP), are used in beef breeding programs since they affect production system profitability. The measure (r^2) of linkage disequilibrium (LD) is used in genome wide association studies to detect genetic markers and major genes (QTL) that influence economically important traits. The aim of this study was to determine the extent of LD in the genome of Nelore cattle, and examine associations between single nucleotide polymorphisms (SNP) and AFC and OP, using a panel of high-density SNPs. Data from 1.182 Nelore born in 2007 and 2008, belonging to Agropecuária Jacarezinho were used. A total of 13 contemporary groups (CG) consisting of farm, season and year of birth, with an average of 90 animals per CG were formed. For genomic-wide association, SNPs with minor allele frequency (MAF) below 0.05, and animals with Call Rate below 0.90 were excluded, totaling 431,885 SNPs. For the statistics analyses, a linear model was used for IPP and a threshold model was used for OP. To estimate the significance of the associations, for both traits, the model included the classificatory fixed effects of GC and SNPs (0,1, and 2). To estimate the allelic substitution effect, the same model was used, considering the SNP effects as covariable. The Bonferroni correction was applied to adjust the limit of significance (1.16×10^{-7}). The average r^2 for all autosomes was 0.18 at a distance of 4.8 kb and the average MAF was 0.25 ± 0.13 . The LD decreased as the distance between markers increased: 0.35 (1 kb) to 0.12 (100 kb). Eleven significant associations were detected in seven different chromosomes (BTA1, BTA4, BTA6, BTA11, BTA17, BTA21, and BTA22). Among these, seven SNPs were associated with AFC and four were linked to the OP. Three SNPs were significant for both traits (BTA1, BTA21, and BTA22). Chromosome BTA21 showed two SNPs associated with OP. A total of 19 chromosomes showed potential QTL regions for AFC and OP. The most evident peaks of significant SNPs, that may suggest potential QTL regions, were located on chromosomes BTA4, BTA6, BTA8, BTA17, and BTA19. Genome wide association, responsible for identifying SNPs linked to the traits AFC and OP, can contribute to the selection of animals sexually precocious.

Keywords: genomic wide association, beef cattle, linkage disequilibrium, age at first calving, heifer pregnancy, *quantitative trait loci*

1. Introdução

Embora o grande foco nos programas de melhoramento genético do Zebu seja as características de crescimento, grande ênfase é dada às características de eficiência reprodutiva, como precocidade sexual. Vários autores, ao desenvolverem modelos bioeconômicos, concluíram que as características reprodutivas são economicamente mais importantes comparadas às de crescimento (KRUPA et al., 2005; WOLFOVA et al., 2005; BRUMATTI et al., 2011). Nesse sentido, estudos mostram que o aumento da produtividade (kg de peso vivo vendido/hectare/ano) pode ser alcançado com a redução da idade ao abate de novilhos, associado a uma menor idade de primeiro serviço das novilhas (PÖTTER et al., 1998, 2000; BERETTA et al., 2001, 2002a,b).

A idade ao primeiro parto (IPP) está ligada à eficiência e à lucratividade da produção de carne bovina, assim como a ocorrência de prenhez precoce (OP). Apesar da IPP ser facilmente obtida e observada cedo na vida do animal, alguns criadores atrasam a entrada das fêmeas na estação de reprodução ao pré-determinarem um peso e/ou idade específicos, prejudicando a identificação de animais precoces e diminuindo a variabilidade genética da característica. (DIAS et al., 2004b). Além disso, a inclusão nas análises apenas dos animais que parem e as baixas estimativas de herdabilidades (MERCADANTE et al., 2000; PEREIRA et al., 2000; DIAS et al., 2004a; PEREIRA et al., 2005; GROSSI et al., 2009; BOLIGON et al., 2010; REGATIERI et al., 2012) fazem com que sua resposta à seleção seja lenta.

A fim de superar as dificuldades que a idade ao primeiro parto apresenta para seleção, a característica ocorrência de prenhez precoce (OP) tem sido empregada nos programas de melhoramento genético. Segundo Shiotsuki et al. (2009), a ocorrência de prenhez é definida pela observação de uma novilha que concebeu e pariu depois de ser exposta à reprodução durante a estação de monta. Essa definição torna a resposta da característica binária (sucesso e fracasso), permitindo que todas as fêmeas sejam incluídas nas análises. Além disso, apresenta maiores estimativas de herdabilidade (0,50 a 0,73), para novilhas expostas pela primeira vez entre os 14 e 18 meses de idade (ELER et al., 2002; ELER et al., 2004; SILVA et al.,

2005; SHIOTSUKI et al., 2009; VAN MELIS et al. 2010; BOLIGON et al., 2011), permitindo assim, uma rápida resposta à seleção.

As características reprodutivas possuem variação genética de natureza quantitativa e podem ter sua expressão influenciada por alguns genes ou bloco de genes (*quantitative trait loci*: QTL). Segundo Höglund et al. (2009), a identificação de QTL para as características reprodutivas de fêmeas pode contribuir para uma melhoria na eficiência de seleção. Ultimamente, a identificação desses genes tem sido realizada pelo desequilíbrio de ligação (LD), calculado por meio da medida do r^2 (quadrado das correlações entre as frequências alélicas dos *loci*) (HAYES, 2009). Para a detecção dos QTL, os marcadores moleculares chamados polimorfismos de base única (SNP) estão sendo os mais utilizados devido à facilidade de genotipagem e por estarem presentes em todo o genoma (HAYES et al., 2006).

Nos últimos anos, painéis de SNPs de 50k foram empregados em bovinos para verificar associações de SNPs com características reprodutivas. Sahana et al. (2010) estudaram 11 características reprodutivas em fêmeas da raça Danish e Swedish e relataram fortes associações de SNPs com características de fertilidade. Pryce et al. (2010) identificaram um suposto QTL para fertilidade (prenhez nos primeiros 42 dias de acasalamento) ao utilizar haplótipos com mais de três SNPs em um estudo com animais da raça Holstein e Jersey. Zhang et al. (2010) relataram associações entre vários SNPs e idade à puberdade em fêmeas da raça Brahman, assim como Hawken et al. (2011), que também observaram associação entre SNPs e intervalo de anestro pós-parto e ocorrência de ovulação pós-parto antes do desmame em animais da raça Brahman e Composto Tropical. Pausch et al. (2011), com o mesmo painel de SNPs, encontraram QTL nos cromossomos 14 e 21 como importantes regiões que afetam a facilidade de parto e o crescimento em bovinos da raça Simental. Fortes et al. (2012), utilizando parte dos dados de Hawken et al. (2011), relataram a presença de SNPs e regiões cromossômicas diretamente associadas à idade à puberdade das fêmeas e à circunferência escrotal.

Estudos de associação ampla, utilizando painéis de alta densidade, ainda não são frequentemente utilizados em zebuínos. Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar as regiões do genoma bovino em

desequilíbrio de ligação e verificar a presença de marcadores genéticos associados às características idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce em bovinos da raça Nelore.

2. Materiais e métodos

Foram utilizadas 1.400 amostras de pelo provenientes de fêmeas da raça Nelore pertencentes à Agropecuária Jacarezinho LTDA, nascidas na fazenda Jacarezinho (Valparaíso - SP) e na fazenda Jacarezinho Nova Terra (Cotegipe - BA). Estas fazendas integram o programa de melhoramento genético da Conexão Delta G. Os objetivos principais na Agropecuária são a venda de reprodutores jovens e animais para abate, contando com um rebanho de mais de 35.000 cabeças de gado.

A estação de monta para vacas tem início em torno da segunda quinzena do mês de novembro com duração de, aproximadamente, 70 dias. Para as novilhas de 14 a 16 meses de idade, realiza-se uma estação de monta antecipada, entre os meses de fevereiro e abril, com duração de, aproximadamente, 60 dias. Todas as novilhas são expostas à reprodução independentemente do peso e da condição corporal. Os sistemas de acasalamentos utilizados são inseminação artificial, monta controlada e reprodutor múltiplo, com relação touro:vaca de 1:50. As épocas de nascimento dos bezerros concentram-se de agosto a outubro e de novembro a janeiro, e os mesmos são mantidos com suas mães até os sete meses de idade, a pasto. As novilhas são avaliadas quanto à prenhez por palpação retal, aproximadamente, 60 dias após o término da estação de monta antecipada. Novilhas que não concebem na estação de monta antecipada são expostas novamente à reprodução aos dois anos de idade. Os critérios de descarte de fêmeas no rebanho são: falha reprodutiva até os dois anos de idade, falha da vaca em um ano, baixa avaliação de desempenho de progênes e, uma pequena percentagem, por problemas de sanidade.

2.1 Consistências dos dados

Para a estimação dos efeitos dos marcadores (SNP) por meio das informações genômicas e fenotípicas, selecionaram-se dos arquivos das fazendas da Agropecuária Jacarezinho LTDA, apenas as fêmeas nascidas em 2007 e 2008, com registros de desempenho e genealogia disponíveis. As informações de desempenho fenotípico são referentes às características associadas à precocidade sexual:

- Idade ao primeiro parto (IPP): definida como a idade da fêmea no momento do primeiro parto.
- Ocorrência de prenhez precoce (OP): definida como sucesso (2), para a novilha que concebeu e pariu com menos de 31 meses de idade, ou fracasso (1) para aquela que não pariu ou que pariu com mais de 31 meses de idade, após monta em torno de 14-16 meses de idade.

Para a consistência dos dados fenotípicos, foram formados 13 grupos de contemporâneas (GC) com número de animais por grupo variando de 8 a 193 e média de 90 animais por GC, tanto para idade ao primeiro parto, quanto para ocorrência de prenhez. Os GC foram constituídos por: fazenda, ano e quinzena de nascimento. Para IPP, foram excluídos registros que estavam fora dos intervalos dados pela média do GC mais ou menos três desvios-padrão (DP) e para OP, foram excluídos GC sem variabilidade genética. Dessa forma, um total de 1.202 fêmeas foram genotipadas.

O DNA foi extraído de folículos pilosos da vassoura da cauda dos animais pelo método Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico. A quantificação e verificação da pureza do DNA extraído foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000. O grau de pureza foi determinado pela relação de absorvância 260/280 (HELD, 2008), referente à verificação da contaminação por proteínas e fenóis e outros contaminantes. A concentração de DNA, sem diluição, variou de 60,98 a 1.630,57 ng/µl, com média de 250,11 ng/µl. Os valores da relação de absorvância estavam dentro do limite de qualidade (1,8 a 2,2), demonstrando a pureza do DNA.

A genotipagem foi realizada utilizando-se o painel BovineHD BeadChip de alta densidade (777.962 SNPs), segundo o protocolo da Illumina - Infinium® II Assay Multi-Sample, com o aparelho HiScan™SQ System. A consistência dos dados genômicos foi realizada através do programa GenomeStudio, também utilizado para gerar os arquivos com as informações de cada SNP para cada animal. Foram considerados todos os 29 autossomos bovinos (BTA) e os genótipos foram definidos como AA e BB (homozigotos), AB (heterozigotos) e NA (não identificados).

Vários critérios de exclusão de SNPs foram utilizados. A Tabela 1 indica o número de SNPs que foram excluídos em cada passo do controle de qualidade.

Tabela 1. Número de SNPs eliminados (N) de acordo com os critérios de exclusão no controle de qualidade da genotipagem pelo BovineHD BeadChip.

Critérios de exclusão	N
MAF < 0,05	288.678
Heterozigose > 0,30	966
<i>Call Freq</i> < 0,93	16.907
Intensidade do cluster A/A_R: média > 0,30	6.546
Intensidade do cluster A/B_R: média > 0,30	4.730
Intensidade do cluster B/B_R: média > 0,30	113
Frequência A/B < 0,10	5.574
Cromossomos sexuais	21.709
Marcador sem posição	824

A frequência do alelo menos comum (MAF) é dada pela frequência em que este alelo ocorre em uma dada população. Em estudos de associação, é utilizado o valor de MAF de 0,05 para que o LD não seja subestimado. SNPs com excesso de heterozigose (> 0,30) e de homozigose (frequência A/B < 0,10) foram excluídos com a finalidade de evitar possíveis erros de genotipagem. Call Freq e Call Rate são medidas utilizadas para representar a eficiência da genotipagem de cada SNP e de cada amostra, respectivamente. São dadas pela porcentagem de SNPs com *Score GenCall* maior do que o limite estabelecido. *Score GenCall* é uma medida de confiança, calculada para cada genótipo, utilizada para filtrar amostras ou SNPs com má qualidade de genotipagem. Neste estudo, foi estabelecido o limite de *ScoreGenCall* ≤ 0,15. A média normalizada da intensidade (R) dos clusters foi critério de exclusão para avaliar a intensidade dos clusters homozigotos e

heterozigotos. Também foram eliminados os SNPs presentes em cromossomos sexuais e os SNPs sem posição definida no cromossomo.

Após o controle de qualidade dos dados genômicos, 431.885 (≈55,51%) SNPs foram utilizados para as análises de associação. Do total de animais genotipados, foram eliminados 20 animais por apresentarem Call Rate < 0,90. O conjunto final dos dados foi composto por 1.182 fêmeas, filhas de 1.150 vacas e 131 touros, sendo que 700 animais tinham pais conhecidos. A idade ao primeiro parto variou de 748 a 1.253 dias e a média foi de $1.049 \pm 139,8$ dias. A porcentagem de fêmeas precoces (Sucesso) e não precoces (Fracasso) foi de 29,31 e 70,69%, respectivamente.

2.2 Desequilíbrio de ligação

O Desequilíbrio de Ligação (LD) entre dois SNPs foi calculado por meio das medidas de r^2 (HILL e ROBERTSON, 1968) como se segue:

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

Em que, freq.A, freq.a, freq.B e freq.b são as frequências dos alelos A, a, B e b, respectivamente, e freq.AB, freq.ab, freq.aB e freq.Ab são as frequências dos haplótipos Ab, ab, aB e Ab, respectivamente, na população. Se os dois loci são independentes, a frequência esperada do genótipo AB (freq.AB) é calculada como o produto entre freq.A e freq.B. Uma freq.AB maior ou menor que o valor esperado indica que esses dois loci em particular tendem a segregar juntos e estão em desequilíbrio de ligação.

As informações de genealogia foram utilizadas para montar a matriz de parentesco e a medida de LD (r^2) foi calculada para todos os pares de marcadores SNPs de cada cromossomo por meio do programa SnppldHD (SARGOLZAEI, M., University of Guelph, Canada).

2.3 Análises de associação

As análises de associação foram realizadas por meio do programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2). Para a característica IPP, assumiu-se uma distribuição normal e um modelo linear. Para a estimativa da significância das associações e do efeito dos SNPs, foram utilizados o procedimento PROC MIXED e o teste estatístico F de Fisher-Snedecor. Para OP, assumiu-se uma distribuição binomial e um modelo não linear. Para as análises de associação, foram realizados o procedimento PROC GENMOD e o teste estatístico Qui-quadrado.

Para estimativa da significância das associações (p-valores) de ambas as características, os genótipos AA, AB e BB foram considerados 0, 1 e 2, respectivamente, e o modelo de análise incluiu o grupo de contemporâneo e os SNPs como efeitos fixos classificatórios. Para a estimativa dos efeitos de substituição alélica, foi utilizado o mesmo modelo considerando os SNPs como covariável. Para manter a taxa de erro ao nível de 5%, foi aplicado o ajuste de Bonferroni e o valor de significância (p-valor) limite para associações significativas correspondeu a valores menores que $1,16 \times 10^{-7}$.

O gráfico quantil-quantil foi utilizado para avaliar a significância geral dos resultados estatísticos de associação genômica e caracterizar como a distribuição observada dos testes segue a distribuição esperada (hipótese nula: hipótese de que não haja SNP associado a qualquer uma das características). Os p-valores observados para cada SNP foram transformados para $-\log_{10}(\text{p-valores})$, sorteados do maior para o menor e plotados em função dos valores esperados de cada distribuição. Os valores observados foram gerados através da função "runif" do software R, que cria uma distribuição uniforme aleatória e seus desvios.

Para observar os SNPs significativamente associados às características em estudo, foi gerado o gráfico Manhattan, onde o $-\log_{10}(\text{p-valores})$ foi plotado em função da posição dos SNPs de cada cromossomo. SNPs fortemente associados às características apresentam p-valores pequenos e, conseqüentemente, seus respectivos $-\log_{10}$ serão elevados.

A taxa de falso positivo (FDR) foi estimada pela equação abaixo (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995):

$$FDR = \frac{nP}{k}$$

Em que, n é o número total de SNPs incluídos na análise de associação, P é o nível de significância (α) utilizado e k é o número de SNPs significativamente associados à característica, àquele nível (α) empregado.

2.4 Regiões de QTL

Uma determinada região de um cromossomo pode ser definida como QTL quando apresentar muitos SNPs significativamente associados a uma ou mais características (SAHANA et al., 2010). Para determinar as possíveis regiões de QTL nesse estudo, um critério subjetivo foi utilizado com base nos picos de SNPs significativos observados nos gráficos Manhattan. Foi considerada como uma possível região de QTL aquela que apresentou SNPs significativos (valores de $-\log_{10}(p)$ maiores que 3,5) concentrados em uma específica posição do cromossomo. SNPs significativos isolados em uma determinada região do cromossomo foram excluídos da definição de QTL devido ao risco de serem falsos positivos.

3. Resultados e discussão

3.1 Desequilíbrio de ligação

O número total de marcadores utilizados para a análise de LD (431.885) abrangeu 115,511.954 Mb do genoma, com uma distância média entre marcadores de $4,8 \pm 2,9$ kb. Um total de 8.732.131 pares de SNPs sintéticos (combinação de pares de SNPs em um mesmo cromossomo) foram analisados para todos os autossomos. Os cromossomos apresentaram tamanhos diferentes, sendo o BTA25 o menor (42,8 Mb) e o BTA1, o maior (158,2 Mb) cromossomo (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição estatística dos dados por cromossomo.

BTA	¹ Tamanho (Mb)	² SNP (n)	³ Distância média ± DP (kb)	⁴ Média r^2 ± DP	⁵ Mediana r^2	⁶ Média MAF ± DP
1	158,2	27.129	4,9 ± 2,9	0,13 ± 0,23	0,017	0,25 ± 0,13
2	136,8	22.898	4,9 ± 2,9	0,19 ± 0,25	0,077	0,25 ± 0,13
3	121,4	22.023	4,9 ± 2,9	0,20 ± 0,25	0,085	0,25 ± 0,13
4	120,6	19.723	4,9 ± 2,9	0,19 ± 0,25	0,074	0,25 ± 0,13
5	121,1	19.353	4,9 ± 2,9	0,21 ± 0,27	0,093	0,26 ± 0,13
6	119,4	22.784	4,9 ± 2,9	0,20 ± 0,25	0,086	0,26 ± 0,13
7	112,6	19.537	4,9 ± 2,9	0,20 ± 0,26	0,081	0,25 ± 0,13
8	113,3	21.406	5,0 ± 2,9	0,21 ± 0,26	0,102	0,26 ± 0,13
9	105,6	19.848	4,9 ± 2,9	0,20 ± 0,26	0,083	0,26 ± 0,13
10	104,3	16.711	4,8 ± 2,9	0,18 ± 0,25	0,065	0,25 ± 0,13
11	107,2	17.809	4,8 ± 2,9	0,19 ± 0,26	0,071	0,25 ± 0,13
12	91,1	14.866	4,9 ± 2,9	0,19 ± 0,25	0,076	0,25 ± 0,13
13	84,2	13.824	5,0 ± 2,9	0,20 ± 0,25	0,085	0,25 ± 0,13
14	83,9	16.198	5,0 ± 2,9	0,19 ± 0,24	0,081	0,26 ± 0,13
15	85,2	14.238	4,9 ± 2,9	0,19 ± 0,25	0,073	0,25 ± 0,13
16	81,7	14.242	4,9 ± 2,9	0,24 ± 0,18	0,077	0,25 ± 0,13
17	75,1	14.014	4,9 ± 2,9	0,20 ± 0,26	0,072	0,24 ± 0,13
18	65,9	11.125	4,8 ± 2,9	0,16 ± 0,23	0,055	0,25 ± 0,13
19	64,0	9.689	4,9 ± 2,9	0,21 ± 0,26	0,090	0,24 ± 0,13
20	71,9	12.240	4,8 ± 2,9	0,18 ± 0,25	0,069	0,25 ± 0,13
21	71,6	12.356	4,9 ± 2,9	0,18 ± 0,24	0,068	0,25 ± 0,13
22	61,3	10.100	4,8 ± 2,9	0,17 ± 0,24	0,067	0,25 ± 0,13
23	52,5	9.054	4,9 ± 2,9	0,17 ± 0,24	0,061	0,26 ± 0,13
24	62,3	10.899	4,9 ± 2,9	0,17 ± 0,24	0,060	0,25 ± 0,13
25	42,8	7.315	4,9 ± 2,9	0,17 ± 0,23	0,063	0,24 ± 0,13
26	51,6	9.219	4,8 ± 2,9	0,16 ± 0,23	0,062	0,24 ± 0,13
27	45,4	7.651	4,9 ± 2,9	0,10 ± 0,18	0,024	0,25 ± 0,13
28	46,2	7.547	4,8 ± 2,9	0,03 ± 0,08	0,004	0,26 ± 0,13
29	51,2	8.087	4,9 ± 2,9	0,003 ± 0,02	0,001	0,24 ± 0,13

¹ Tamanho dos cromossomos; ² Número de SNPs analisados por cromossomo; ³Distância média entre SNPs analisados; ^{4,5}Medidas de desequilíbrio de ligação(r^2) por cromossomo; ⁶Média de MAF por cromossomo; SNP: Polimorfismo de base única; MAF: Frequência do alelo menos comum; DP: Desvio-padrão.

A média de r^2 para todos os autossomos foi de 0,18 (Tabela 3), com amplitude de 0,003 a 0,24. Amplitude superior de LD para a raça Nelore (mínimo de 0,06 e máximo de 0,69), foi descrita por McKay et al. (2007), utilizando 2.670 marcadores SNPs. Silva et al. (2010) encontraram valor médio de LD ($r^2 = 0,21$) próximo ao descrito neste estudo, empregando um chip de 50k e touros da raça Gir.

Foram encontrados poucos trabalhos sobre LD em *Bos indicus*. Segundo a literatura, em geral, os valores de r^2 para animais taurinos são superiores aos encontrados para zebuínos. McKay et al. (2007) descreveram valor médio de r^2 para animais *Bos indicus* e *Bos taurus* de 0,37 e 0,56, respectivamente. Segundo esses autores, isto acontece devido à relação inversa existente entre o tamanho da população e o LD. Animais *Bos taurus* tiveram sua população muito reduzida após a domesticação (GODDARD et al., 2009) e após o intenso processo de seleção

aplicada sobre algumas raças. Sargolzaei et al. (2008), utilizando um chip de 10k para genotipagem de animais da raça Holstein, encontraram média de r^2 superior à do presente trabalho (0,31). Por meio do chip de 50k, Lu et al. (2012) descreveram valores médios de r^2 (para distâncias de até 30 kb), superiores em *Bos taurus* (0,29 e 0,22 para Angus e Charolês, respectivamente), mas similares ao do presente estudo para cruzados (0,21).

O valor médio de MAF, considerando todos os autossomos estudados, foi de $0,25 \pm 0,13$. Resultado similar foi relatado por Khatkar et al. (2008), que descreveram o valor médio de $0,286 \pm 0,0013$ para MAF em animais da raça Holstein-Friesian. O valor de MAF encontrado no presente trabalho foi comparável aos observados por Matukumalli et al. (2009) para animais de raças taurinas como Charolês (0,26), Holstein (0,26) e Angus (0,25) e superior aos descritos por estes autores para zebuínos, como Brahman (0,18), Gir (0,19) e Nelore (0,19). Esta superioridade pode ser devido ao fato de esses autores terem utilizado um chip de 50k que contém menor quantidade de SNP significativos para zebu que o de 770k.

Uma alta porcentagem de SNPs (58%) apresentou MAF maior que 0,2 (Figura 1), apontando que o efeito dos baixos valores de MAF não deve influenciar as medidas de LD. Os cromossomos BTA2, BTA7, BTA11, BTA12, BTA17, BTA25, BTA26 e BTA29 apresentaram alta proporção de SNPs com MAF $< 0,10$ enquanto os cromossomos BTA1, BTA5, BTA6, BTA8, BTA9, BTA23 e BTA28 apresentaram baixa proporção.

A fim de verificar o declínio dos valores de LD à medida que a distância física entre os marcadores aumentou, os SNPs foram classificados em intervalos de distância. Com isso, um valor médio de r^2 foi estimado para cada classe de distância em cada autossomo (Figura 2) e para o genoma inteiro (Tabela 3).

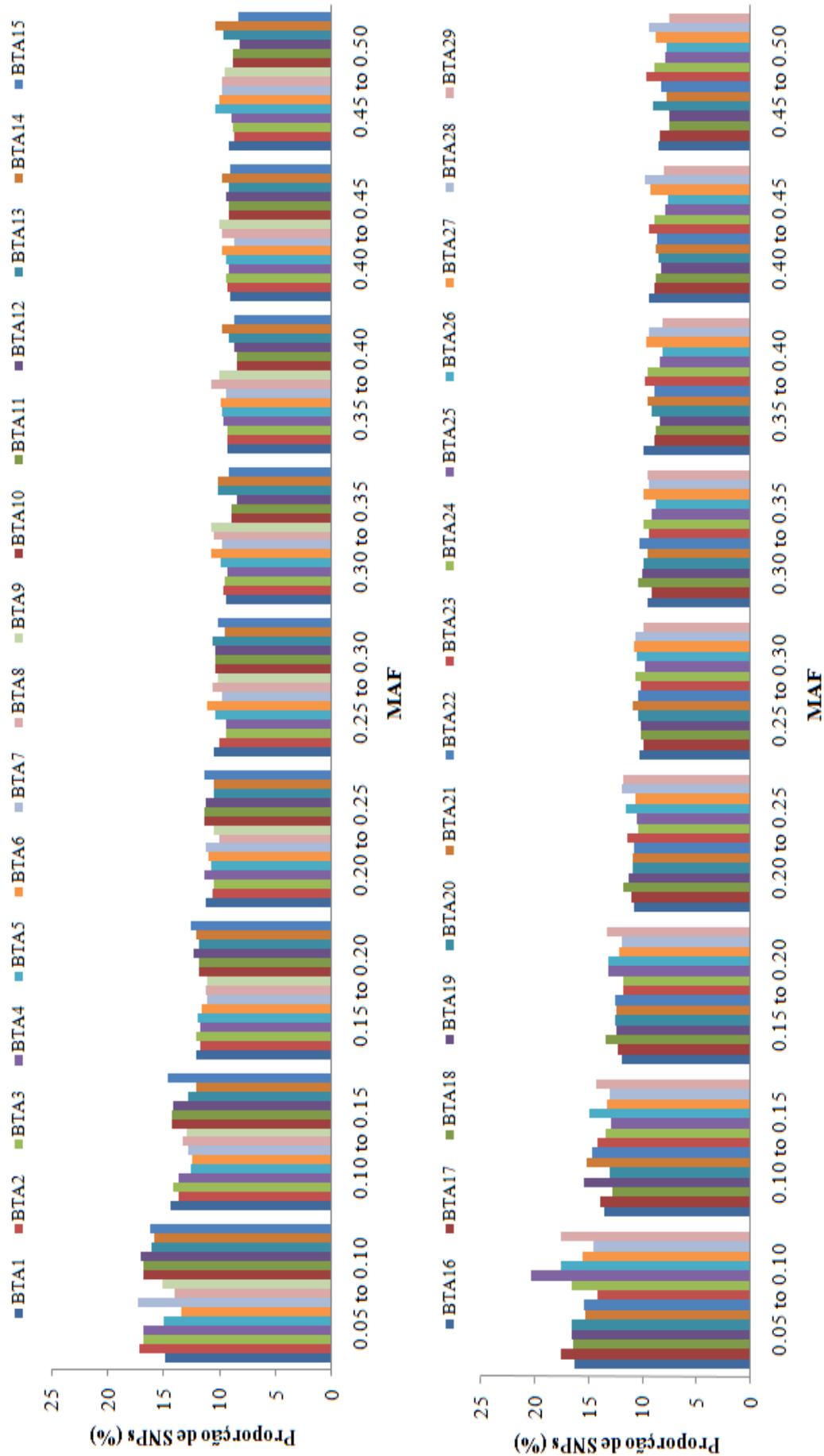
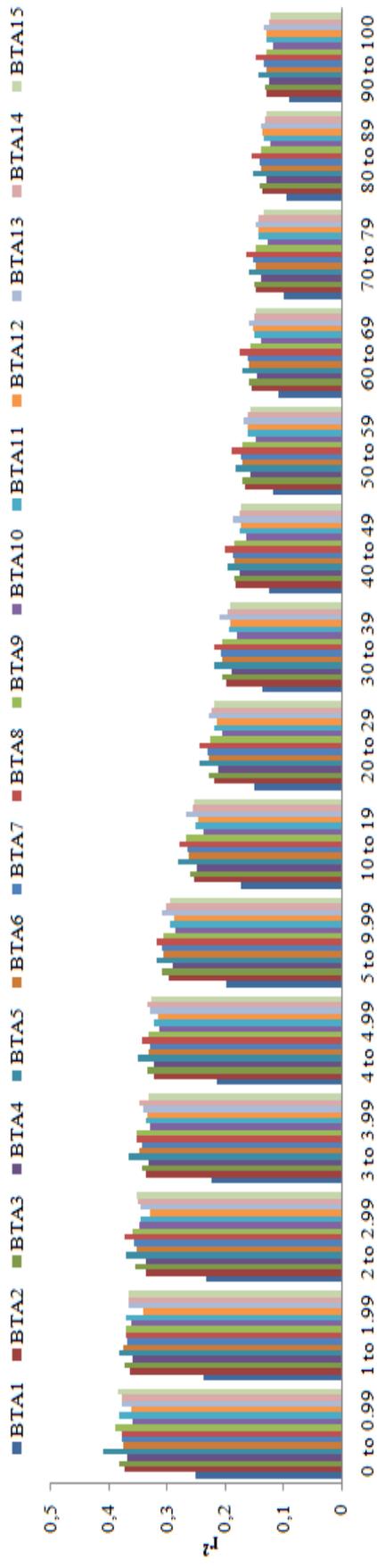
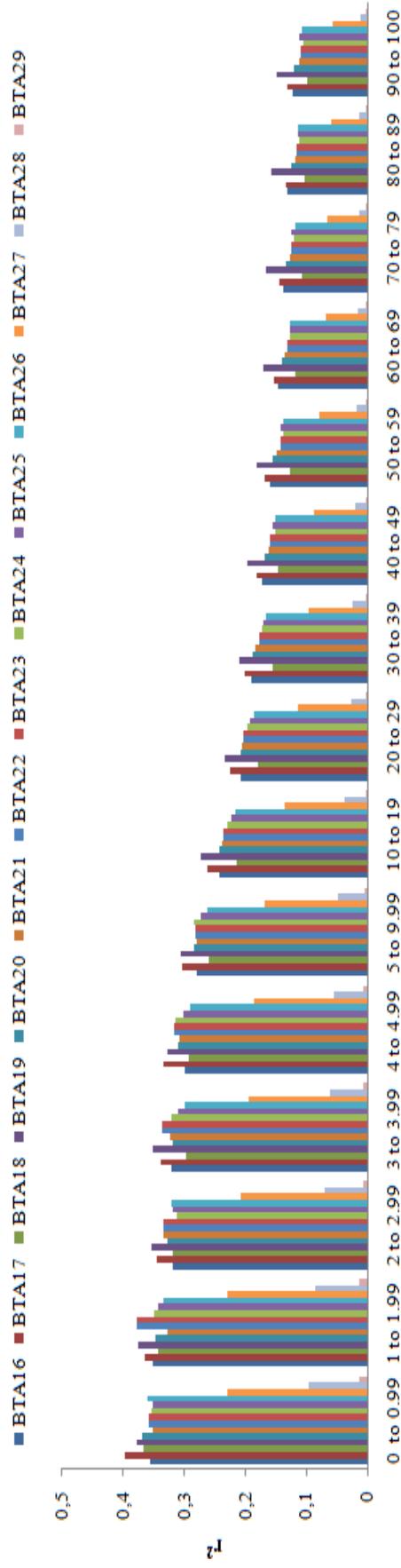


Figura 1. Proporção de SNPs de acordo com classes de MAF, nos cromossomos bovinos (BTA) 1 ao 29.



Distância entre marcadores (kb)



Distância entre marcadores (kb)

Figura 2. Desequilíbrio de ligação médio (r^2) em função da distância entre marcadores, nos cromossomos bovinos (BTA) 1 ao 29.

Como esperado, houve uma redução dos valores de LD com o aumento da distância física entre os marcadores (Figura 2). Moderados níveis de r^2 (0,21 a 0,35) foram observados a distâncias menores que 30 kb. Quando a distância entre os marcadores aumentou de 30 para 100 kb, os valores de r^2 diminuíram (0,12 a 0,18). Isso pode ser explicado pelo fato de que a taxa de recombinação em curtas distâncias é menor e, dessa forma, maiores níveis de LD são encontrados. Os resultados encontrados são similares aos relatados por McKay et al. (2007), que descreveram níveis de r^2 variando de 0,15 a 0,20 a uma distância de 100 kb. A diminuição do LD com o aumento da distância entre os marcadores também foi observada por De Roos et al. (2008) para animais de várias raças (Holstein-Friesian, Jersey e Angus), com o r^2 decrescendo de valores entre 0,22 a 0,35 (distâncias de até 40 kb), até valores entre 0,14 a 0,16 (distâncias de 80 a 100 kb). O mesmo ocorreu nos estudos de Lu et al. (2012), em que o valor médio de LD diminuiu de 0,29 para 0,19 (Angus), de 0,22 para 0,12 (Charolês) e de 0,21 para 0,11 (animais cruzados) quando a distância aumentou de 0 - 30 kb para 70 - 100 kb. Diferentemente do presente estudo, alto LD ($r^2 = 0,58$) foi descrito por Sargolzaei et al. (2008) para distâncias entre SNPs de até 100 kb, em animais da raça Holstein. Apenas em distâncias de 100 kb a 1 Mb, os autores observaram uma diminuição no LD ($r^2 = 0,15$ a 0,02).

Tabela 3. Medidas de desequilíbrio de ligação (r^2) por intervalos de distâncias.

Distância (kb)	Média $r^2 \pm DP$	Mediana r^2
0 – 1	0,35 \pm 0,34	0,22
1 – 2	0,34 \pm 0,31	0,20
2 – 3	0,32 \pm 0,30	0,19
3 – 4	0,31 \pm 0,30	0,18
4 – 5	0,30 \pm 0,29	0,16
5 – 10	0,28 \pm 0,28	0,14
10 – 20	0,24 \pm 0,26	0,11
20 – 30	0,21 \pm 0,25	0,09
30 – 40	0,18 \pm 0,23	0,07
40 – 50	0,17 \pm 0,22	0,06
50 – 60	0,15 \pm 0,21	0,06
60 – 70	0,14 \pm 0,20	0,06
70 – 80	0,13 \pm 0,20	0,05
80 – 90	0,13 \pm 0,19	0,04
90 – 100	0,12 \pm 0,19	0,04

DP: Desvio-padrão.

3.2 Estudos de Associação

A distribuição dos p-valores obtidos para todos os SNPs, nas análises de associação de ambas as características, foi examinada através do gráfico quantil-quantil (Gráfico Q-Q). Os p-valores observados correspondem com os p-valores esperados na faixa inicial da reta (Figuras 3 e 4), região em que não se rejeita a hipótese de nulidade (baixos p-valores). A partir de $-\log_{10}(\text{p-valor})$ esperado igual a aproximadamente 1,8 para IPP e 1,0 para OP, rejeita-se a hipótese de nulidade, ou seja, rejeita-se a hipótese de que não haja SNP associado à característica. O gráfico demonstra que muitos p-valores observados foram mais significativos que os esperados sobre a hipótese nula para IPP e para OP.

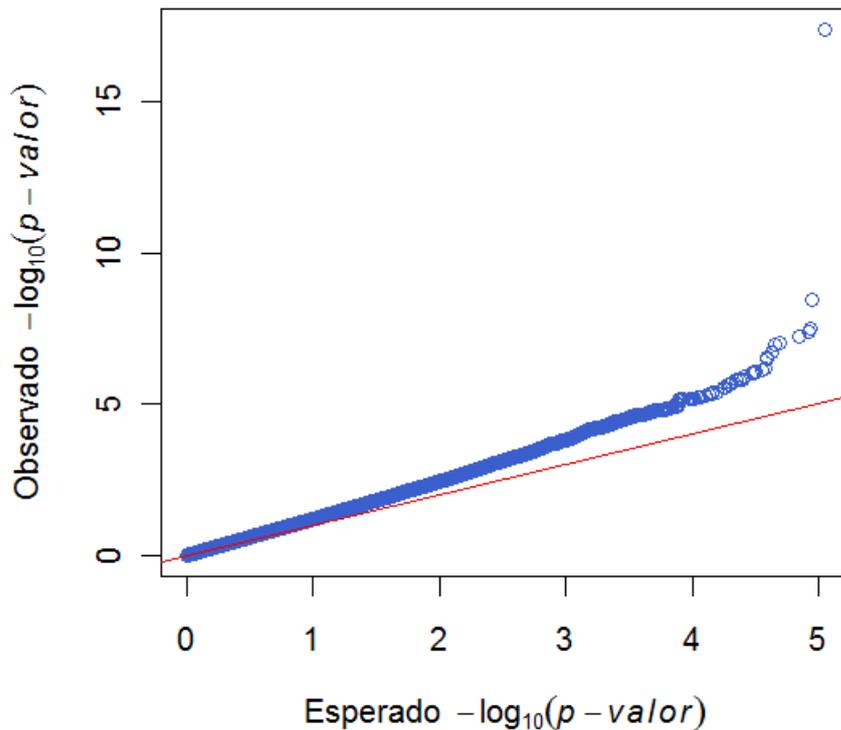


Figura 3. Gráfico Q-Q comparando valores observados e esperados $-\log_{10}(\text{p-valores})$ para idade ao primeiro parto.

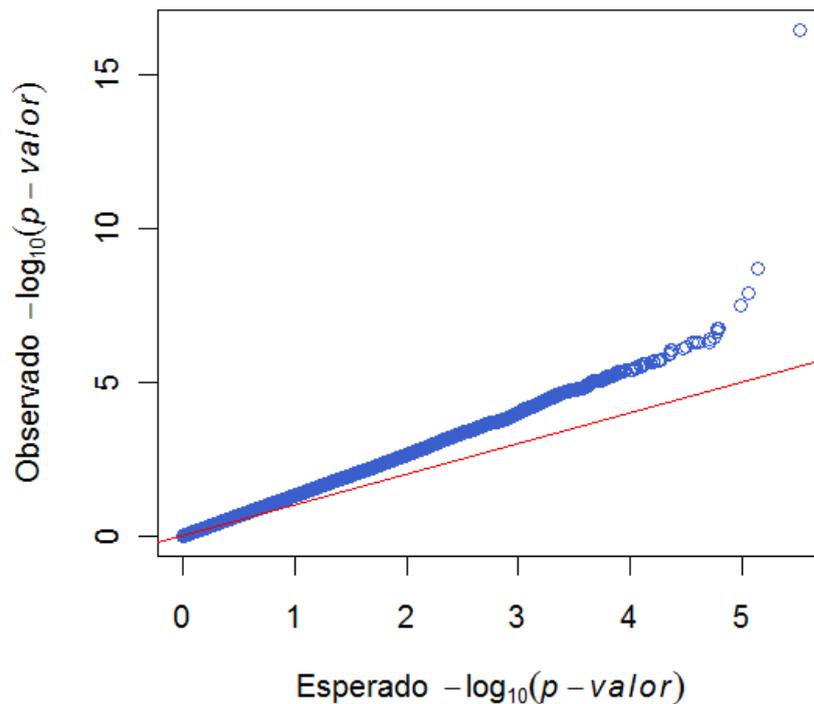


Figura 4. Gráfico Q-Q comparando valores observados e esperados de $-\log_{10}(\text{p-valores})$ para ocorrência de prenhez precoce.

Foram detectados SNPs significativos em todos os cromossomos ao nível de 5, 1 e 0,1% de significância para IPP e OP (Tabela 4). O número de SNPs significativos a 5% representa aproximadamente 8,3% (IPP) e 10,2% (OP) do total de SNPs utilizados nas análises de associação. Resultado próximo (6,8%) foi descrito por Zhang et al. (2010) ao analisar idade à puberdade em animais da raça Brahman ($p < 0,05$) utilizando o Bovine SNP50 BeadChip. Com esse mesmo chip, Fortes et al. (2011) constataram que 5,8% (Composto Tropical) e 6,7% (Brahman) dos SNPs foram significativos ($p < 0,05$) para 22 características, incluindo idade à puberdade.

Tabela 4. Número de SNPs (N) significativos, média dos p-valores (entre parênteses) e taxa de falso positivo (FDR), em três níveis de significância (α).

Significância (α)	IPP		OP	
	N	FDR (%)	N	FDR (%)
5%	35.750 (0,022)	60	43.926 (0,021)	49
1%	9.594 (0,004)	45	12.951 (0,004)	33
0,1%	1.630 (0,0004)	27	2.349 (0,0004)	18

IPP: Idade ao primeiro parto; OP: Ocorrência de prenhez precoce; FDR: Taxa de falso positivo.

A percentagem de falsos positivos foi maior para IPP que para OP. Valores superiores de FDR foram descritos por Pryce et al. (2010) para prenhez nos primeiros 42 dias de acasalamento (FDR = 53%), em animais da raça Holstein, ao nível de significância de 0,1%. A este mesmo nível, Hawken et al. (2011) descreveram valor muito próximo de FDR para idade à puberdade (FDR = 26%) em animais Brahman.

Um grande número de SNPs significativos foi observado em específicas regiões de alguns cromossomos, indicando potenciais regiões de QTL para as características IPP e OP. Para a característica idade ao primeiro parto (Figura 5), 18 cromossomos apresentaram picos de SNPs significativos (BTA2, BTA3, BTA4, BTA5, BTA6, BTA8, BTA10, BTA11, BTA16, BTA17, BTA19, BTA20, BTA21, BTA23, BTA24, BTA25 e BTA26), segundo o critério subjetivo utilizado para detecção de potenciais regiões de QTL. Os picos mais evidentes, que podem indicar potenciais QTL, foram os encontrados nos cromossomos BTA4 (entre 21,1 a 21,4 Mb), BTA17 com dois picos (entre 19,1 a 25,6 Mb e entre 58,3 a 67,9 Mb) e BTA19 (entre 58,7 a 61,7 Mb).

Para ocorrência de prenhez precoce (Figura 6), 18 cromossomos também apresentaram picos de SNPs significativos (BTA2, BTA3, BTA4, BTA5, BTA6, BTA8, BTA9, BTA10, BTA11, BTA14, BTA16, BTA17, BTA19, BTA20, BTA23, BTA24, BTA25 e BTA26), segundo o mesmo critério subjetivo utilizado. Dentre eles, os SNPs mais evidentes encontraram-se nos cromossomos BTA6 (entre 86,4 a 89,4 Mb e entre 99,8 a 108,8 Mb), BTA8 (entre 57,7 a 58,4 Mb e entre 104,0 a 105,8 Mb) e BTA 17 com dois picos (entre 19,1 a 25,6 Mb e entre 65,7 a 71,8 Mb) e no cromossomo BTA19 (entre 58,7 a 61,7 Mb).

Os cromossomos BTA17 e BTA19 apresentaram picos evidentes tanto para IPP quanto para OP e, desta forma, há indícios de que estejam associados a um mesmo QTL ou gene ligado a características reprodutivas. Schulman et al. (2008), em animais da raça Finnish Ayrshire, também relataram um QTL no cromossomo 19 associado à característica tratamentos para fertilidade, que inclui informações sobre tratamentos realizados por um veterinário no prazo de 150 dias após o parto e informações sobre abates devido a problemas de fertilidade. Sahana et al. (2011) mencionaram SNPs no cromossomo BTA19 (25,32 a 41,98 Mb) significativamente

associados à facilidade de parto e sobrevivência do bezerro em animais Danish and Swedish Holstein. Recentemente, Oikonomou et al. (2011) encontraram uma potencial ($p = 0.077$) associação entre um polimorfismo no gene STAT5A localizado no cromossomo BTA19 (43,03 a 43,05 Mb) e idade ao primeiro parto, em animais da raça Holstein. Segundo Khatib et al. (2009), o polimorfismo SNP12195 no éxon 8 do gene STAT5A está associado à taxa de fertilização e sobrevivência embrionária *in vitro*.

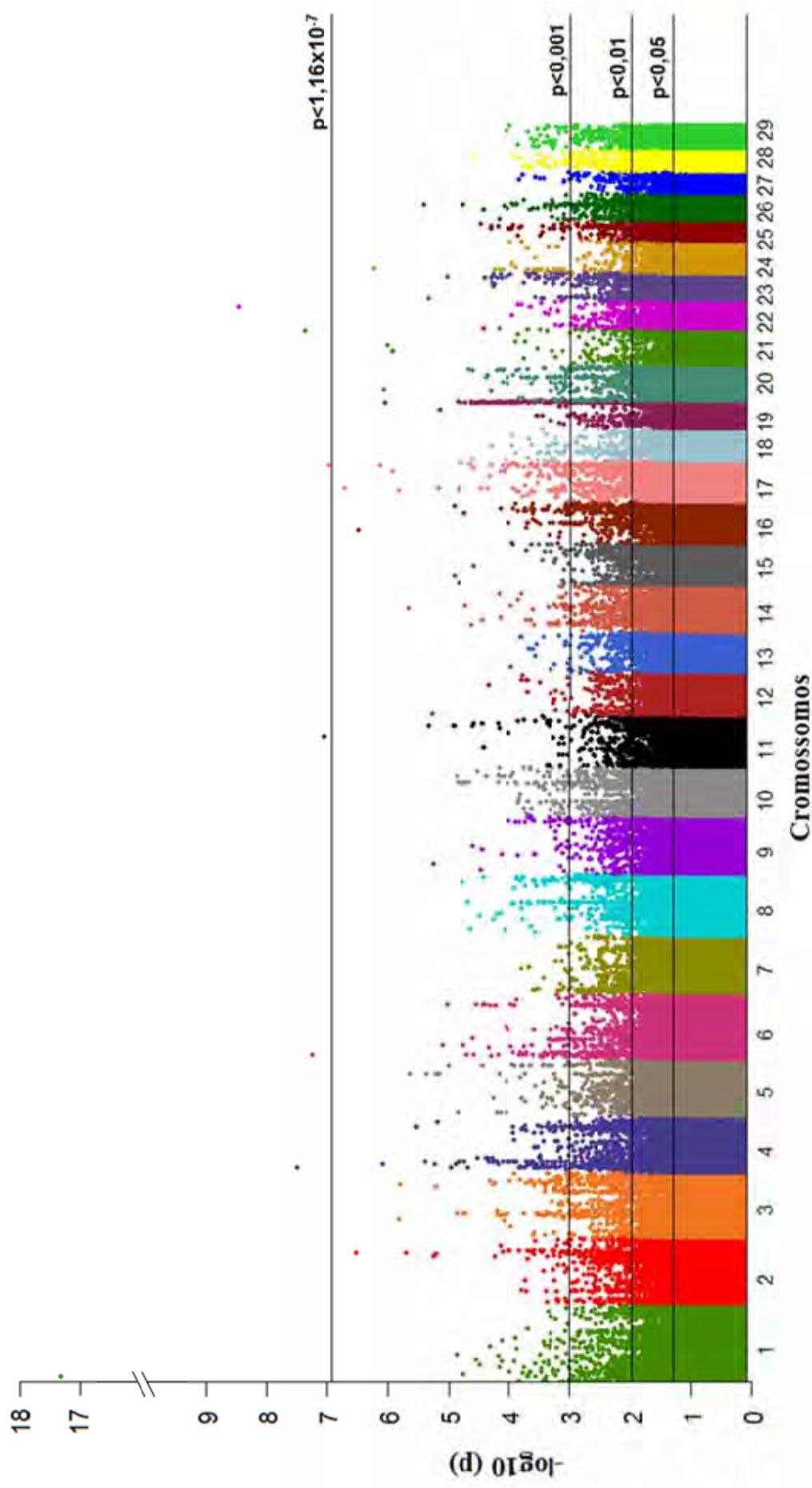


Figura 5. Gráfico Manhattan para idade ao primeiro parto. O $-\log_{10}(p\text{-valores})$ está plotado em função dos SNPs de cada cromossomo.

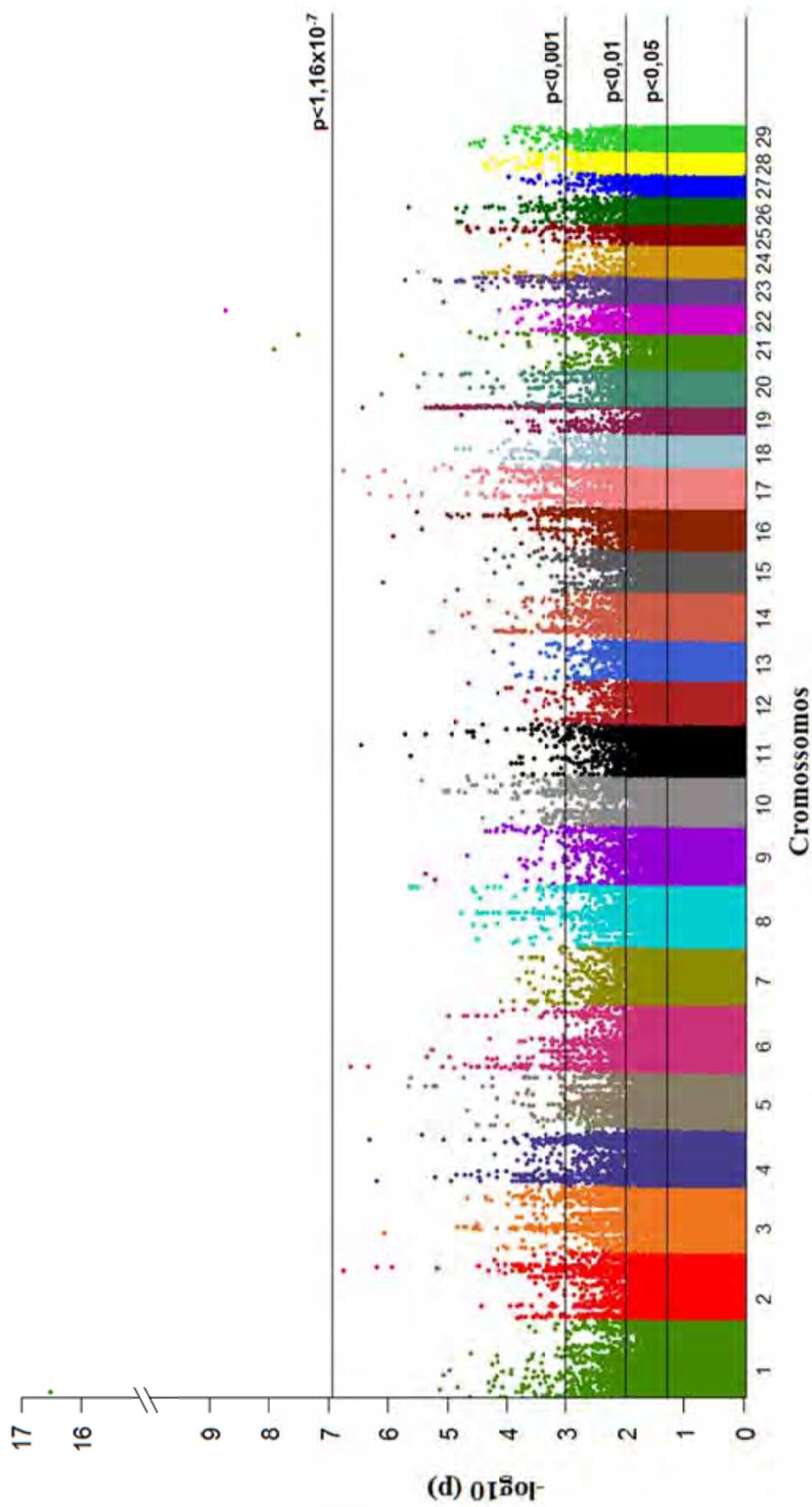


Figura 6. Gráfico Manhattan para ocorrência de prenhez precoce. O $-\log_{10}(p\text{-valore})$ está plotado em função dos SNPs de cada cromossomo.

Os cromossomos com possíveis regiões de QTL relatados nesse estudo estão de acordo com outros resultados encontrados na literatura. Picos de SNPs significativos foram observados nos cromossomos BTA2 e BTA6 tanto para IPP como para OP e no cromossomo BTA14 para OP, indicando possíveis regiões de QTL. Ashwell et al. (2004) também descreveram os cromossomos BTA6 e BTA14 como possíveis portadores de QTL relacionados à taxa de prenhez em animais da raça Holstein. Para essa mesma raça, Daetwyler et al. (2008) identificaram QTL nos cromossomos BTA2 associado ao intervalo do parto ao primeiro serviço e no cromossomo BTA14 associado à idade ao primeiro serviço. Assim como observado no presente estudo, Olsen et al. (2009) mencionaram QTL no cromossomo BTA6 afetando ocorrência de distocia e natimortos, em animais da raça Swedish e Norwegian. Da mesma forma, Sahana et al. (2010) também encontraram QTL em cromossomos semelhantes, entre tantos outros, em animais Danish e Swedish Holstein. Os autores relataram uma região de QTL no cromossomo BTA4 (88.1 a 94.0 Mb), no cromossomo BTA6 (87.9 a 90.0 Mb) e no cromossomo BTA21 (14.9 a 16.1 Mb) ligadas a um índice de fertilidade e às características número de inseminação em vacas, intervalo da primeira à última inseminação, intervalo do parto à primeira inseminação. Em um estudo posterior, utilizando esta mesma raça e 14 características ligadas ao parto, Sahana et al. (2011) detectaram QTL nos mesmos cromossomos citados por nós, entre eles: o cromossomos BTA4 (43,48 a 48,78 Mb), BTA6 (115,10 a 119,03 Mb), BTA19 (25,32 a 41,98 Mb) e BTA20 (43,75 a 47,53 Mb). Schulman et al. (2011) também encontraram QTL nos cromossomos BTA2, BTA4 e BTA20 para taxa de não retorno à segunda inseminação e número de dias do parto à seguinte prenhez, para animais da raça Finnish Ayrshire. Da mesma forma que uma possível região de QTL foi observada no cromossomo BTA21 para IPP no presente estudo, Pausch et al. (2011) identificaram três SNPs em alto desequilíbrio de ligação, definindo uma região de QTL para a característica facilidade de parto em animais Fleckvieh, no cromossomo BTA21 (2.15 a 2.39 Mb).

Após a correção de Bonferroni (p -valor limite = $1,16 \times 10^{-7}$), sete cromossomos (Figuras 3 e 4) apresentaram SNPs significativamente associados às características IPP (7 SNPs) e OP (4 SNPs) (Tabela 5). As frequências desses polimorfismos estão presentes na Tabela 6.

Tabela 5. SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).

Característica	SNP	Cromossomo	Posição (pb)	p-valor
IPP	BovineHD0100003126	1	9816619	$4,27 \times 10^{-18}$
	BovineHD0400002732	4	8853684	$3,2 \times 10^{-8}$
	BovineHD0600002088	6	8937501	$5,75 \times 10^{-8}$
	BovineHD1100017335	11	60860824	$8,97 \times 10^{-8}$
	BovineHD1700018953	17	65795029	$1,06 \times 10^{-7}$
	BovineHD2100019377	21	66082472	$4,28 \times 10^{-8}$
	BovineHD2200012994	22	44861196	$3,58 \times 10^{-9}$
OP	BovineHD0100003126	1	9816619	$3,45 \times 10^{-17}$
	BovineHD2100011237	21	38863958	$1,3 \times 10^{-8}$
	BovineHD2100019377	21	66082472	$3,17 \times 10^{-8}$
	BovineHD2200012994	22	44861196	$1,93 \times 10^{-9}$

SNP: Polimorfismo de base única; Posição: posição do SNP no cromossomo.

Tabela 6. Frequências genótípicas e alélicas dos SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).

Característica	SNP	Cromossomo	Freq (AA)	Freq (AB)	Freq (BB)	Freq (A)	Freq (B)
IPP	BovineHD0100003126	1	0,14	0,47	0,39	0,37	0,63
	BovineHD0400002732	4	0,01	0,22	0,77	0,12	0,88
	BovineHD0600002088	6	0,58	0,38	0,04	0,77	0,23
	BovineHD1100017335	11	0,04	0,30	0,66	0,19	0,81
	BovineHD1700018953	17	0,26	0,47	0,27	0,49	0,51
	BovineHD2100019377	21	0,16	0,49	0,35	0,40	0,60
	BovineHD2200012994	22	0,01	0,22	0,77	0,12	0,88
OP	BovineHD0100003126	1	0,14	0,47	0,39	0,37	0,63
	BovineHD2100011237	21	0,35	0,51	0,14	0,61	0,39
	BovineHD2100019377	21	0,16	0,49	0,35	0,40	0,60
	BovineHD2200012994	22	0,01	0,22	0,77	0,12	0,88

SNP: Polimorfismo de base única; Freq(AA): Frequência do genótipo AA; Freq(AB): Frequência do genótipo AB; Freq(BB): Frequência do genótipo BB; Freq(A): Frequência do alelo A; Freq(B): Frequência do alelo B.

Três SNPs, localizados nos cromossomos BTA1, BTA21 e BTA22 (Figuras 5 e 6), influenciaram significativamente ambas as características. O cromossomo BTA21 apresentou dois SNPs relacionados à ocorrência de prenhez precoce. O maior nível de significância detectado, para as duas características, (p -valor = $4,27 \times 10^{-18}$ para IPP e p -valor = $3,45 \times 10^{-17}$ OP) ocorreu com o mesmo SNP (BovineHD0100003126), situado no cromossomo BTA1.

Com base no Map Viewer - Build 6.1 (NCBI, 2013) para bovinos, foram encontrados vários genes próximos aos SNPs significativos ao nível de Bonferroni

para IPP e OP (Tabela 7). A distância está determinada em pares de bases do SNP até o início ou do SNP até o final do gene, de acordo com a posição do polimorfismo no cromossomo. Distância igual à zero indica que o SNP está localizado dentro da região do gene.

Tabela 7. Genes mais próximos aos SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).

Característica	SNP	Cromossomo	Posição (pb)	Gene	Distância (pb)
IPP	BovineHD0100003126	1	9816619	APP	0
	BovineHD0400002732	4	8853684	LOC100140224	8642
	BovineHD0600002088	6	8937501	LOC526064	112370
	BovineHD1100017335	11	60860824	TMEM17	73913
	BovineHD1700018953	17	65795029	LOC100848089	54197
	BovineHD2100019377	21	66082472	SETD3	0
	BovineHD2200012994	22	44861196	ARHGEF3	0
OP	BovineHD0100003126	1	9816619	APP	0
	BovineHD2100011237	21	38863958	LOC785745	587632
	BovineHD2100019377	21	66082472	SETD3	0
	BovineHD2200012994	22	44861196	ARHGEF3	0

SNP: Polimorfismo de base única; Posição: posição no SNP no cromossomo; Distância: distância entre gene e SNP.

O SNP BovineHD0100003126 do cromossomo 1 está localizado no gene APP (9,60 a 9,92 Mb), responsável pela formação da proteína precursora amilóide, que após sofrer clivagem, produz o peptídeo beta amilóide (A4). Em humanos, a proteína APP e seus peptídeos estão relacionados com a doença de Alzheimer (FRIDMAN et al., 2004). Segundo The Gene Ontology Consortium, o gene APP também está associado ao metabolismo do colesterol (precursor de hormônios esteroides da reprodução) e ao acasalamento reprodutivo, resultando na fecundação e formação de zigotos. O gene TMEM17 (60,93 a 60,94 Mb), localizado no cromossomo 11, codifica uma proteína transmembrana. O SNP significativo do cromossomo 21 está localizado no gene SETD3 (66,06 a 66,12 Mb), altamente expresso em tecidos musculares e responsável por ativar a transcrição de genes relacionados com o músculo, induzindo a diferenciação celular (EOM et al., 2011). No cromossomo 22, há evidências que o gene ARHGEF3 (44,56 a 44,88 Mb) tenha função na regulação

da absorção de ferro e na maturação do eritrócito (SERBANOVIC-CANIC et al., 2011).

Os resultados obtidos nesse estudo em relação à localização dos SNPs significativos nos cromossomos BTA1, BTA4, BTA6, BTA11, BTA17, BTA21 e BTA22, são semelhantes aos de vários trabalhos publicados na literatura envolvendo associações entre SNPs e características ligadas a fertilidade. Sahana et al. (2010) também encontraram SNPs afetando características de fertilidade nos cromossomos BTA1 (4 SNPs – 72,07 a 148,76 Mb), BTA4 (3 SNPs – 36,81 a 90,41 Mb), BTA6 (1 SNP – 89,77 Mb), BTA21 (1 SNP – 15,64 Mb) e BTA22 (1 SNP – 24,99 Mb), entre outros, em fêmeas da raça Danish e Swedish. Os SNPs estavam associados ao índice de fertilidade para prenhez, ao intervalo da primeira à última inseminação em vacas, ao número de inseminação por concepção em vacas e ao intervalo de parto à primeira inseminação. Do mesmo modo, Schulman et al. (2011) relataram um SNP significativo no cromossomo BTA1 (88,06 Mb) e no cromossomo BTA4 (34,90 Mb), associados, respectivamente, às características número de inseminação e taxa de não retorno ao parto, em novilhas da raça Finnish Ayrshire. Pausch et al. (2011) descreveram três SNPs significativos para facilidade de parto em fêmeas da raça Fleckvieh no cromossomo BTA21 (2,15 a 2,38 Mb). Da mesma forma, Hawken et al. (2011) encontraram SNPs significativos nos cromossomos BTA6 e BTA21 para intervalo de anestro pós-parto e nos cromossomos BTA6, BTA17 e BTA21 para a primeira ovulação pós-parto antes do desmame, em animais da raça Brahman. Em contrapartida, os resultados do presente trabalho diferem dos relatados por Fortes et al. (2012) ao realizarem um estudo com parte dos dados de Hawken et al. (2011). Apenas o cromossomo BTA14 apresentou SNPs significativamente associados à idade à puberdade em novilhas Brahman (134 SNPs) e idade do touro a uma circunferência escrotal de 26 cm (146 SNPs).

O efeito de substituição do alelo A pelo alelo B dos SNPs significativos (Tabela 8) pode estar superestimado devido ao fato de as análises terem sido realizadas considerando um SNP de cada vez e os efeitos de poligenes não terem sido incluídos no modelo. Além disso, as estimativas dos efeitos podem estar influenciadas pela distribuição das frequências alélicas.

Tabela 8. Efeito de substituição alélica (alelo A para alelo B) dos SNPs significativamente associados à idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, após correção de Bonferroni (p -valor = $1,16 \times 10^{-7}$).

Característica	SNP	Cromossomo	Efeito	Erro-padrão	Polimorfismo
IPP (dias)	BovineHD0100003126	1	41,43	6,70	A/G
	BovineHD0400002732	4	11,97	7,33	T/C
	BovineHD0600002088	6	34,62	7,17	T/C
	BovineHD1100017335	11	21,88	8,47	T/C
	BovineHD1700018953	17	34,65	8,44	T/G
	BovineHD2100019377	21	-19,00	5,21	A/G
	BovineHD2200012994	22	25,75	5,24	A/C
OP (%)	BovineHD0100003126	1	-42	7	A/G
	BovineHD2100011237	21	-12	5	A/G
	BovineHD2100019377	21	20	5	A/G
	BovineHD2200012994	22	-27	5	A/C

SNP: Polimorfismo de base única; Efeito: Efeito de substituição do alelo A pelo alelo B; Polimorfismo: Substituição do nucleotídeo no SNP.

4. Conclusões

O valor médio de desequilíbrio de ligação ($r^2 = 0,18$) encontrado ao longo do genoma dos animais de raça Nelore permite a realização dos estudos de associação genômica. A medida de LD diminui com o aumento da distância entre os marcadores.

Dezenove cromossomos apresentaram potenciais regiões de QTL para as características idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce.

Sete e quatro SNPs foram significativamente associados às características idade ao primeiro parto e ocorrência de prenhez precoce, respectivamente. Três desses SNPs, localizados em três cromossomos diferentes, foram relacionados com ambas as características.

5. Referências

- ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; DA, Y.; VANRADEN, P.M.; RON, M.; WELLER, J.I.; LEWIN, H.A. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.468-475, 2004.
- BENJAMINI, Y. e HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.85, p.289–300, 1995.
- BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETTO, C.G.A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas pecuários de cria diferindo na idade das novilhas ao primeiro parto e na taxa de natalidade do rebanho no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1278-1286, 2001.
- BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETTO, C.G.A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas de recria e engorda de gado de corte no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.696-706, 2002a.
- BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETTO, C.G.A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas de produção de gado de corte de ciclo completo no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.991-1001, 2002b.
- BOLIGON, A.A.; ALBUQUERQUE, L.G.; MERCADANTE, M.E.Z.; LOBO, R.B. Study to relations between age at first calving, average weight gains and weights from weaning to maturity in Nelore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.746-751, 2010.
- BOLIGON, A.A.; ALBUQUERQUE. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Production Science**, v.141, p.12–16, 2011.
- BRUMATTI, R.C.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; FORMIGONNI, I.B. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p.205-213, 2011.

DAETWYLER, H.D.; SCHENKEL, F.S.; SARGOLZAEI, M.; ROBINSON, J.A.B. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3225-3236, 2008.

DE ROOS, A.P.W.; HAYES, B.J.; SPELMAN, R.J.; GODDARD, M.E. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. **Genetics**, v.179, p.1503-1512, 2008.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. Estimativas de herdabilidade para idade ao primeiro parto na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.97-102, 2004a.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. Efeito da idade de exposição de novilhas à reprodução sobre estimativas de herdabilidade da idade ao primeiro parto em bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.370-373, 2004b.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.II.V.; FERRAZ, DIAS, J.B.S.; OLIVEIRA, H.N.; EVANS, J.L.; GOLDEN, B.L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.951-954, 2002.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.II V.; EVANS, J.L.; FERRAZ, J.B.S.; DIAS, F.; GOLDEN B. L. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2519-2527, 2004.

EOM, G.H.; KIM, K.B.; KIM, J.H.; KIM, J.Y.; KIM, J.R.; KEE, H.J.; KIM, D.W.; CHOE, N.; PARK, H.J.; SON, H.J.; CHOI, S.Y.; KOOK, H.; SEO, S.B. Histone methyltransferase SETD3 regulates muscle differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.34733-34742, 2011.

FORTES, M.R.; REVERTER, A.; NAGARAJ, S.H.; ZHANG, Y.; JONSSON, N.N.; BARRIS, W.; LEHNERT, S.; BOE-HANSEN, G.B.; HAWKEN, R.J. A single nucleotide polymorphism-derived regulatory gene network underlying puberty in 2 tropical breeds of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1669-83, 2011.

FORTES, M. R. S.; LEHNERT, S. A.; BOLORMAA, S.; REICH, C.; FORDYCE, G.; CORBET, N.J.; WHAN, V.; HAWKEN, R.J.; REVERTER, A. Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. **Animal Production Science**, v.52, p.143-150, 2012.

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S.P.; NETO, E. D.; OJOPI, E.P.B. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Revista de psiquiatria clínica**, v.31, p.19-25, 2004.

GODDARD, M.E. e HAYES, B.J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.381-391, 2009.

GROSSI, D.A.; VENTURINI, G.C.; PAZ, C.C.; BEZERRA, L.A.; LÔBO, R.B.; OLIVEIRA, J.A.; MUNARI, D.P. Genetic associations between age at first calving and heifer body weight and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.126, p.387-393, 2009.

HAWKEN, R.J.; ZHANG, Y.D.; FORTES, M.R.S.; COLLIS, E.; BARRIS, W.C.; CORBET, N.J.; WILLIAMS, P.J.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R.G.; WALKLEY, J.R.W.; BARENDSE, W.; JOHNSTON, D.J.; PRAYAGA, K.C.; TIER, B.; REVERTER, A.; LEHNERT, S.A. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.90, p.1398-1410, 2011.

HAYES, B.J.; LIEN, S.; NILSEN, H.; OLSEN, H.G.; BERG, P.; MACEACHERN, S.; POTTER, S.; MEUWISWSEN, T.E. The origin of selection signatures on bovine chromosome 6. **Animal Genetics**, v.39, p.105-101, 2006.

HAYES, B.J. Whole Genome Association and Genomic Selection. Jaboticabal, SP: FUNEP, 120p (Course Notes), 2009.

HELD, P. Measure Your Purity: Assessment of Nucleic Acid Purity via UV Absorbance. **G.I.T. Laboratory Journal**, v.12, p.9-11, 2008.

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

HÖGLUND, J.K.; GULDBRANDTSEN, B.; SU, G.; THOMSEN, B.; LUND, M.S. Genome scan detects quantitative trait loci affecting female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2136-2143, 2009.

KHATIB, H.; HUANG, W.; WANG, X.; TRAN, A.H.; BINDRIM, A.B.; SCHUTZKUS, V.; MONSON, R.L.; YANDELL, B.S. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2238-2247, 2009.

KHATKAR, M.S.; NICHOLAS, F.W.; COLLINS, A.R.; ZENGER, K.R.; CAVANAGH, J.A.L.; BARRIS, W.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; RAADSMA, H.W. Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. **BMC Genomics**, v.9, p.187-204, 2008.

KRUPA, E.; WOLFOVA, M.; PESKOVICOVA, D.; HUBA, J.; KRUPOVA, Z. Economic values of traits for Slovakian Pied cattle under different marketing strategies. **Czech Journal of Animal Science**, v.50, p.483-492, 2005.

LU, D.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; LI, C.; VANDER VOORT, G.; WANG, Z.; PLASTOW, G.; MOORE, S.; MILLER, S.P. Linkage disequilibrium in Angus, Charolais and Crossbred beef cattle, **Frontiers in Genetics**, v.3, p.152-161, 2012.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; ALLAN, M.F.; HEATON, M.P.; O'CONNELL, J.; MOORE, S.S.; SMITH, T.P.L.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSEL, C.P. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. **PLoS ONE** 4(4): e5350. doi:10.1371/journal.pone.0005350, 2009.

McKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; MURDOCH, B.M.; MATUKUMALLI, L.K.; AERTS, J.; COPPIETERS, W.; CREWS, D.; NETO, E.D.; GILL, C.A.; GAO, C.; MANNEN, H.; STOTHARD, P.; WANG, Z.; VAN TASSEL, C.P.; WILLIAMS, J.L.; TAYLOR, J.F.; MOORE, S.S. Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle, 2007. **BMC Genetics**, v.8, p.74-85, 2007.

MERCADANTE, M.E.Z.; LOBO, R.B.; OLIVEIRA, H.N. Estimativas de (co)variância entre características de reprodução e de crescimento em fêmeas de um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.997-1004, 2000.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913&build=6.1>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2013.

OIKONOMOU, G.; MICHAILEDIS, G.; KOUGIOUMTZIS, A.; AVDI, M.; BANOS, G. Effect of polymorphisms at the STAT5A and FGF2 gene loci on reproduction, milk yield and lameness of Holstein cows. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.235-239, 2011.

OLSEN, H.G.; HAYES, B.J.; KENT, M.P.; NOME, T.; SVENDSEN, M.; LIEN, S. A genome-wide association study for QTL affecting direct and maternal effects of stillbirth and dystocia in cattle. **Animal Genetics**, v.41, p.273-280, 2009.

PAUSCH, H.; FLISIKOWSKI, K.; JUNG, S.; EMMERLING, R.; EDEL, C.; GOTZ, K.-U.; FRIES, R. Genome-Wide Association study identifies two major loci affecting calving ease and growth-related traits in cattle. **Genetics**, v.187, p.289-297, 2011.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1676-1683, 2000.

PEREIRA, J.C.C.; RIBEIRO, S.H.A.; SILVA, M.A.; BERGMANN, J.A.G.; COSTA, M.D. Análise genética de características ponderais e reprodutivas de fêmeas bovinas Tabapuã. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.231-236, 2005.

PÖTTER, L.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETTO, C.G.A. Produtividade de um modelo de produção para novilhas de corte primíparas aos dois, três e quatro anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.613-619, 1998.

PÖTTER, L.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETTO, C.G.A. Análises econômicas de modelos de produção com novilhas de corte primíparas aos dois, três e quatro anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.861-870, 2000.

PRYCE, J.E.; BOLORMAA, S.; CHAMBERLAIN, A.J.; BOWMAN, P.J.; SAVIN, K.; GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. A validated genome-wide association study in two dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3331-3345, 2010.

REGATIERI, I. C.; BOLIGON, A. A.; BALDI, F.; ALBUQUERQUE, L. G. Genetic correlations between mature cow weight and productive and reproductive traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p.2979-2986, 2012.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; BENDIXEN, C.; LUND, M.S. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Animal Genetics**, v.41, p.579-588, 2010.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; LUND, M.S. Genome-wide association study for calving traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.479-486, 2011.

SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F.S.; JANSEN, G.B.; SCHAEFFER, L.R. Extent of Linkage Disequilibrium in Holstein Cattle in North America. **American Dairy Science Association**, v.91, p.2106-2117, 2008.

SCHULMAN, N.F.; SAHANA, G.; LUND, M.S.; VIITALA, S.M.; VILKKI, J.H. Quantitative trait loci for fertility traits in Finnish Ayrshire cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.40, p.195-214, 2008.

SCHULMAN, N.F.; SAHANA, G.; ISO-TOURU, T.; MCKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; LUND M.S.; TAYLOR, J.F.; VIRTA, J.; VIKKI, J.H. Mapping of fertility traits in Finnish Ayrshire by genome-wide association analysis. **Genetics Selection Evolution**, v.42, p.263-269, 2011.

SERBANOVIC-CANIC, J.; CVEJIC, A.; SORANZO, N.; STEMPEL, D.L.; OUWEHAND, W.H.; FRESON, K. Silencing of RhoA nucleotide exchange factor, ARHGEF3, reveals its unexpected role in iron uptake. **Blood**, v.118, p.4967-4976, 2011.

SHIOTSUKI, L.; SILVA, J.A.V.; TONHATI, H.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic associations of sexual precocity with growth traits and visual scores of conformation, finishing, and muscling in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1591-1597, 2009.

SILVA, J.A.IV.; DIAS, L.T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1568-1572, 2005.

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

GO Consortium: The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements. In: **Nucleic Acids Research**. 38, 2009, S. D331-D335, doi:10.1093/nar/gkp1018.

VAN MELIS, M.H.; ELER, J.P.; ROSA, G.J.M.; FERRAZ, J.B.S.; FIGUEIREDO, L.G.G.; MATTOS, E.C.; OLIVEIRA, H.N. Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer pregnancy and stayability in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3809-3813. 2010.

WOLFOVA, M.; WOLF, J.; ZHRADKOVA, R.; PRIBIYL, J.; DANO, J.; KRUPA, E.; KICA, J. Breeding objectives for beef cattle used in different production system. 2. Model application to production system with the Charolais breed. **Livestock Production Science**, v.95, p.217-230, 2005.

ZHANG, Y.D.; TIER, B.; HAWKEN R.J. Whole Genome Analysis of Heifer Puberty in Brahman Cattle. In: 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, from 1 to 6 of August of 2010, Leipzig, Germany, 2010. CD-ROM.