

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Tese

**Desequilíbrio de ligação e associação de polimorfismos relacionados à
resistência ao carrapato em bovinos Hereford e Braford**

Patrícia Biegelmeier

Pelotas, 2015

Patrícia Biegelmeier

**Desequilíbrio de ligação e associação de polimorfismos relacionados à
resistência ao carrapato em bovinos Hereford e Braford**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Melhoramento Animal.

Orientador: Ph.D. Fernando Flores Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:

Patrícia Biegelmeier

Desequilíbrio de ligação e associação de polimorfismos relacionados à resistência
ao carrapato em bovinos Hereford e Braford

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de setembro de 2015.

Banca examinadora:

.....
Ph.D. Fernando Flores Cardoso (Orientador)
Doutor em Ciências Animais pela Michigan State University.

.....
Dra. Arione Augustini Boligon
Doutora em Genética e Melhoramento Animal pela Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho.

.....
Dr. José Braccini Neto
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa.

.....
Dr. Leandro Lunardini Cardoso
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Aos meus pais, Adalberto e Leani, por toda a compreensão, apoio incondicional, motivações em momentos difíceis, e lições sobre resiliência.

Ao meu irmão, Roberto, pelo compartilhamento de algumas combinações pitorescas de genes.

Ao meu orientador, Ph.D. Fernando Flores Cardoso, pelos desafios, lições profissionais, incentivos, paciência e oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello, pela co-orientação, conversas e constante disponibilidade em me ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas e à Embrapa Pecuária Sul pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

À Conexão Delta G, por fornecer os dados utilizados nas análises.

Aos colegas do Laboratório de Bioinformática e Estatística Genômica da Embrapa Pecuária Sul, pelo convívio, companheirismo e ajudas.

Aos demais colegas e amigos que, de uma forma ou outra, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta tese.

Aos acasos e boas surpresas da vida.

“Ignorance more frequently begets confidence than does knowledge: it is those who know little, and not those who know much, who so positively assert that this or that problem will never be solved by science.”

(Charles R. Darwin)

“Science never solves a problem without creating ten more.”

(George B. Shaw)

Resumo

BIEGELMEYER, Patrícia. **Desequilíbrio de ligação e associação de polimorfismos relacionados à resistência ao carrapato em bovinos Hereford e Braford**. 2015. 126f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A incorporação de informações fornecidas pelos marcadores moleculares nas avaliações genéticas é uma estratégia promissora para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento animal. Entendendo a importância de estudos que analisem e divulguem resultados da aplicação desta tecnologia, esta tese foi estruturada para inicialmente apresentar uma revisão sobre os principais conceitos relacionados ao uso da genômica e à resistência de bovinos ao carrapato. Em capítulos posteriores são apresentados os resultados obtidos em dois estudos envolvendo rebanhos Hereford e Braford. No primeiro deles são apresentados níveis de desequilíbrio de ligação (r^2), persistência de fase e tamanho efetivo das populações (N_e). Para tanto, 391 bovinos Hereford e 2.079 Braford foram genotipados com chips de média densidade (50K) e 40 touros com chips de alta densidade (HD). As médias \pm desvio-padrão de r^2 observadas foram $0,21 \pm 0,27$ para Hereford e $0,16 \pm 0,22$ para Braford. O atual N_e da população Hereford foi estimado em 153 indivíduos e em 220 na Braford. As raças apresentaram níveis moderados a altos de persistência de fase em todas as distâncias entre marcadores, sendo as correlações mais altas ($> 0,9$) observadas em distâncias de até 50Kb. O r^2 diminuiu rapidamente à medida que a distância entre marcadores aumentou, mas níveis considerados úteis para o mapeamento de QTLs ($r^2 > 0,2$) foram encontrados em distâncias de até 50Kb. Nas populações Hereford e Braford analisadas são necessários, respectivamente, ao menos 50 mil e 150 mil SNP para condução de estudos de associação ampla ou de seleção genômica eficientes. Os níveis de persistência de fase observados indicaram que em distâncias próximas ($< 50Kb$) os efeitos de SNP verificados em uma população são iguais na outra. O segundo estudo realizou uma análise de associação genômica ampla para identificar regiões do genoma relacionadas à resistência de bovinos ao carrapato. Foi utilizada a metodologia GBLUP de passo único para verificar a variância genética capturada por janelas de 16 SNP adjacentes, em dois cenários: S1 (onde o algoritmo utilizado recalcula os efeitos de SNP a cada iteração) e S2 (tanto o efeito de SNP como de animal são recalculados). Foram utilizados dados de contagens de carrapatos de 928 animais Hereford e 3.435 Braford, dos quais 3.545 foram genotipados com chips 50K e 131 touros com chips HD. No S1 e S2, as 10 janelas com maior variância genética explicaram, respectivamente, 7,28% e 16,65% da

variação genética. Não foi encontrada sobreposição entre nenhuma das 10 regiões de maior variância nos dois cenários com QTLs associados à resistência descritos na literatura. Entre as 10 janelas com maior variância genética, quatro foram comuns aos dois cenários. A anotação funcional demonstrou que estas regiões abrigam ou estão próximas de genes envolvidos em processos relacionados à imunidade inata, processos inflamatórios, entre outros, indicando serem potenciais candidatas para estudos de mapeamento fino. Devido à complexa natureza da resistência de bovinos ao carrapato, é importante que mais estudos sejam conduzidos para melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na sua expressão.

Palavras-chave: bovinos de corte; estudo de associação genômica ampla; GBLUP de passo único; *loci* de características quantitativas; polimorfismos de base única; resistência ao carrapato

Abstract

BIEGELMEYER, Patrícia. **Linkage disequilibrium and polymorphism association related to tick resistance in Hereford e Braford cattle**. 2015. 126f. Thesis (Doctor of Science) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The possibility of incorporating information from molecular markers in genetic evaluation processes is an important strategy to increase efficiency of animal breeding programs. Understanding the importance of studies that explore the possibility of genomic technologies application in animal production, this thesis was structured in order to initially provide a brief review of the main concepts related to the use of genomics and to cattle tick resistance. In later chapters, results of studies involving the application of genomic tools in Hereford and Braford breeds are presented and discussed. The first study was conducted to estimate linkage disequilibrium (r^2), persistence of phase and effective population size (N_e), using information from 391 Hereford and 2,079 Braford animals genotyped with Illumina BovineSNP50v2 chips (50K), and from 40 bulls genotyped with high-density chips (HD). Average $r^2 \pm$ standard deviation were 0.21 ± 0.27 for Herefords and 0.16 ± 0.22 for Brafords. Current estimated N_e for Brafords and Herefords was 220 and 153, respectively. Breeds demonstrated moderate to strong persistence of phase at all distances. The greatest phase correlations ($r > 0.9$) were found in the 0-50Kb bins. Estimated r^2 decreased rapidly with increasing distance between SNP, however, useful linkage for QTL mapping and genomic selection ($r^2 > 0.2$) was found spanning to ~50Kb. SNP panels containing about 50,000 and 150,000 are necessary to design effective genome-wide association and genomic selection studies to Hereford and Braford breeds, respectively. Markers are expected to be in phase with QTL alleles in distances < 50 Kb in both populations due to observed high levels persistence of phase. The objective of the second study was to conduct a genome-wide association study to identify genomic regions (windows with 16 adjacent SNP) associated with cattle tick resistance using the single-step GBLUP procedure. Analysis considering two scenarios: S1 (which iterates on SNP weights and SNP effect) and S2 (in which SNP weight and effects, and also animal effects were recomputed). Information of tick counts on 928 Hereford and 3,435 Braford bovines was used. From the total of 4,363 animals with phenotypic data, 3,545 were genotyped with 50K and 131 sires were also genotyped with HD. The top 10 windows with largest fraction of variance explained 7.28% of additive genetic variance in S1, and 16.65% of variance in S2. Some peaks associated with high proportion of variance were identified as common to S1 and S2. The four top 10 windows common to both scenarios were mapped close or within genes related to innate immune responses, inflammatory processes and others pathways. Despite

none of the top 10 SNP windows of S1 or S2 overlapped any QTL previously described to tick resistance in literature, they provide regions and genes which are potential candidates to be involved in the expression of resistance for further fine mapping studies. Due to the high complexity of tick resistance expression, more studies should be developed combining GWAS with other methods results for a better understanding about genes and pathways involved in the expression of resistance.

Key-words: beef cattle; genome-wide association study; quantitative trait *loci*; single nucleotide polymorphisms; *single-step* GBLUP; tick resistance

Lista de Figuras

5 Artigo 1

Figure 1	Extent of linkage disequilibrium (r^2) as a function of inter-marker distance in Hereford and Braford populations	61
Figure 2	Extent of linkage disequilibrium (r^2) \pm standard errors for adjacent markers by chromosomes in Hereford and Braford populations	64
Figure 3	Linkage disequilibrium (r^2) as a function of inter-marker distance (considering chips of 150K (20Kb); 80K (38Kb); 50K (60Kb); 20K (150Kb); 8K (375Kb); and 3K (1000Kb) in chromosomes 6, 10 and 23 in Hereford and Braford populations	65
Figure 4	Estimated effective population size (N_e) as a function of generation in the past in Hereford and Braford populations	66
Figure 5	Correlation of phase (r) between Hereford and Braford populations for SNP pairs at varying marker distances	67

6 Artigo 2

Figure 1	<i>Manhattan plots</i> for percentage of variance explained by 16 SNP windows for tick resistance obtained by ssGBLUP/S1 after the first (1A), second (1B) and third (1C) iteration, and by ssGBLUP/S2 after the first (1D), second (1B) and third (1F) iteration. The x-axis represents location of 16 SNP window. The y-axis represents the proportion of genetic variance of 2,578 SNP windows	85
Figure 2	<i>Manhattan plots</i> for SNP effects solutions for tick resistance obtained by ssGBLUP/S1 after the first (2A), second (2B) and third (2C) iteration, and by ssGBLUP/S2 after the first (2D), second (2E) and third (2F) iteration. The x-axis represents SNP location. The y-axis represents the solutions effects of 41,045 SNP	86

Lista de Quadros

Quadro 1	Cronograma de execução das atividades referentes ao projeto	46
Quadro 2	Investimentos parciais referentes aos custos com extração de DNA e genotipagens dos animais envolvidos no projeto	47

Lista de Tabelas

5 Artigo 1

Table 1	Average $r^2 \pm$ SD between adjacent markers according to inter-marker distances in Hereford and Braford populations	61
Table 2	Average $r^2 \pm$ SD for adjacent SNP according to marker panel density in Hereford and Braford populations	62
Table 3	Percentage of adjacent SNP with average $r^2 > 0.2$ and > 0.3 according to marker panel density in Hereford and Braford populations	62
Table 4	Number of SNP, average $r^2 \pm$ SD and mean of length distances between adjacent markers in autosomes of Hereford and Braford populations	63

6 Artigo 2

Table 1	Windows with less than 16 SNP generated from the 41,045 markers available after quality control	84
Table 2	Top 20 windows explaining the highest proportion of genetic variance for tick resistance obtained by S1 (iterates on SNP weights and SNP effects) and S2 (iterates on SNP weights and SNP and animal effects) in the third iteration	87
Table 3	Annotated genes within the four windows ranked as top 10 for both scenarios S1 (iterates on SNP weights and SNP effects) and S2 (iterates on SNP weights and SNP and animal effects)	88
Table 4	Annotated genes neighboring (1 Mb to left and right) the four windows ranked as top 10 for both scenarios S1 (iterates on SNP weights and SNP effects) and S2 (iterates on SNP weights and SNP and animal effects)	88

Sumário

1	Introdução	15
2	Revisão de Literatura	19
2.1	Genômica no Melhoramento Animal – Conceitos gerais	19
2.2	Seleção Genômica	23
2.3	Estudos de Associação Genômica Ampla	30
2.4	Resistência genética de bovinos ao carrapato	33
3	Projeto de Pesquisa	39
3.1	Caracterização do Problema	40
3.2	Objetivos e Metas	42
3.3	Metodologia e Estratégia de Ação	42
3.4	Resultados e Impactos Esperados	45
3.5	Cronograma, Riscos e Dificuldades	46
3.6	Aspectos Éticos	47
3.7	Orçamento	47
3.8	Referências Bibliográficas	48
4	Relatório do Trabalho de Campo	50
4.1	Local	50
4.2	Período Experimental	50
4.3	Animais Avaliados	50
4.4	Coleta de Dados	51
4.5	Análises Estatísticas	51
4.6	Resultados	52

5 Artigo 1 – Linkage disequilibrium, persistence of phase and effective population size estimates in Hereford and Braford cattle	53
Abstract	54
Background	55
Methods	56
Results	60
Discussion	67
Conclusions	70
References	71
6 Artigo 2 – Genome-wide association study for tick resistance in Hereford and Braford	77
Abstract	78
Background	79
Methods	80
Results	84
Discussion	89
Conclusions	92
References	93
7 Considerações Finais	103
Referências	105

1 Introdução

Os desafios impostos à bovinocultura de corte no Brasil exigem o direcionamento de esforços de diversos segmentos ligados à cadeia produtiva, visando a obtenção e implementação de alternativas que permitam otimizar os índices zootécnicos dos rebanhos nacionais. Graças aos resultados de pesquisas nos campos da nutrição, sanidade e genética animal, muitos progressos ocorreram nas últimas décadas em resposta à adoção de práticas como suplementação alimentar e de sal mineral, adequações nos manejos sanitários e de pastagens, e introdução de biotécnicas reprodutivas (MACEDO, 2006).

Na busca por maior eficiência e produtividade dos rebanhos, o melhoramento genético animal desempenha papel fundamental, gerando ganhos genéticos médios de 1 a 2% ao ano em diversas características através da aplicação de ferramentas como a seleção e os sistemas de cruzamentos (SIMM et al., 2000; CARDOSO et al., 2013). Comparativamente às melhorias no ambiente de criação dos animais para que estes aumentem seu potencial produtivo, as práticas de melhoramento genético apresentam como vantagens o fato de serem de menor custo, além de gerarem ganhos cumulativos, de longo prazo na propriedade (CARDOSO, 2007). O grande número de programas de avaliação genética atualmente em andamento no Brasil e a valorização de animais portadores de DEPs¹ estimadas para características economicamente relevantes reforçam o papel de destaque assumido pelo melhoramento genético aplicado a bovinos de corte no país (EUCLIDES FILHO, 2009).

Não obstante os avanços já alcançados, as transformações socioambientais, políticas e econômicas que vêm se apresentando no cenário mundial evidenciam a necessidade de adequação da pecuária frente ao novo panorama. Fatores como

¹Em programas de melhoramento, a DEP (diferença esperada na progênie) é uma medida da diferença entre o desempenho médio dos filhos de determinado indivíduo e o desempenho médio dos filhos de um grupo de touros referência (TORRES JR. et al., 2013).

crescentes pressões de mercados externos e constante competitividade com outros tipos de carne continuam exigindo o engajamento de todos os ramos do setor na busca por soluções que garantam a rentabilidade da atividade a médio e longo prazo. Além desses fatores, novas percepções dos consumidores sobre aspectos relacionados à saúde, qualidade da carne, bem-estar animal e uso consciente de recursos naturais influenciarão cada vez mais a demanda da carne bovina (EUCLIDES FILHO, 2013).

Os programas de melhoramento genético em bovinos de corte por muito tempo foram conduzidos enfatizando-se apenas características relacionadas à capacidade de crescimento e à eficiência reprodutiva dos animais (O'NEILL et al., 2010; DECKER et al., 2012). Como forma de acompanhar as evoluções no mercado da carne, é necessário um direcionamento mais amplo do melhoramento genético nos rebanhos, considerando-se, além das características tradicionalmente enfatizadas (como precocidades de acabamento e reprodutiva), características relacionadas à eficiência alimentar, ao impacto ambiental do sistema de produção, à qualidade do produto, à longevidade, e à resistência dos animais a adversidades ambientais, doenças e parasitas (CARDOSO et al., 2013; EUCLIDES FILHO, 2013; NIETO et al., 2013).

Em sistemas de produção desenvolvidos de forma extensiva e em regiões tropicais, a maior exposição dos rebanhos a agentes ambientais estressores, como a sazonalidade na oferta de pastagens de qualidade, altas temperaturas e infestações por endo e ectoparasitas são alguns dos desafios que exigem uma boa habilidade de adaptação dos animais ao ambiente (TIZIKARA et al., 1985; MIRKENA et al., 2010). No Brasil, a incidência de infestações parasitárias é responsável por grandes perdas econômicas, destacando-se as causadas por carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) e moscas (*Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis*). Estima-se que os prejuízos causados apenas pelos carrapatos nos rebanhos nacionais sejam da ordem de US\$ 3,24 bilhões ao ano (GRISI et al., 2014). Frente às limitações apresentadas pelo controle baseado exclusivamente no uso de carrapaticidas (FRISCH, 1999; MARTINS; FURLONG, 2001), métodos alternativos para controle do carrapato nas propriedades têm sido pesquisados (RODRÍGUEZ VALLE et al., 2004; WILLADSEN, 2006; WEBSTER et al., 2015). Diversos estudos relataram a existência de variabilidade genética para a característica de resistência ao carrapato, indicando a possibilidade de utilizar a seleção de animais mais resistentes ou o cruzamento entre

raças ou grupos genéticos como método auxiliar no controle do parasita (WAMBURA et al., 1998; BURROW, 2001; FRAGA et al., 2003; BUDELI et al., 2009; BIANCHIN et al., 2006; JONSSON et al., 2006; SILVA et al., 2010; HÜE et al., 2014; AYRES et al., 2015; PASSAFARO et al., 2015).

Visto que a seleção tem como objetivo aumentar a frequência de alelos favoráveis na população através da escolha de pais avaliados como geneticamente superiores para a característica de interesse (EUCLIDES FILHO, 1999), a obtenção de estimativas acuradas dos valores genéticos dos reprodutores é muito importante para o sucesso do processo. Como apenas uma parcela da variabilidade fenotípica observada nos candidatos à seleção é de origem genética aditiva² e passível de ser herdada pela progênie, deve-se priorizar pela qualidade das informações utilizadas nas estimativas dos parâmetros genéticos da população analisada, pois a falta de acurácia das estimativas de herdabilidade e correlações genéticas e fenotípicas pode reduzir a eficiência do critério de seleção a ser utilizado (MACHADO et al., 1999; GONÇALVES et al., 2011).

As inovações tecnológicas ocorridas principalmente após o sequenciamento completo do DNA bovino em 2009 (THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009) permitiram que atualmente os métodos convencionais de estimação de parâmetros genéticos com base em dados fenotípicos e de pedigree atualmente sejam assistidos pela inclusão das informações fornecidas por milhares de marcadores moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), no processo denominado seleção genômica (MEUWISSEN et al., 2001). A incorporação de dados provenientes diretamente do genoma dos animais permite aumentar a acurácia dos valores genéticos estimados e, conseqüentemente, a eficiência do processo de seleção (SCHAEFFER, 2006; GODDARD; HAYES, 2007; MEUWISSEN et al., 2013).

Entre as metodologias estatísticas que vêm sendo testadas por pesquisadores para otimizar a combinação dos dados de performance, pedigree e genômicos está o procedimento de passo único (*single-step*), que combina as informações dos marcadores com o fenótipo e o pedigree para a estimação simultânea dos valores genéticos e utiliza uma matriz que combina o parentesco tradicional com base no

²De maneira simplificada, considera-se que a variabilidade fenotípica observada em características de natureza poligênica, como as quantitativas, é resultado da soma dos efeitos da variância causada por diferenças genéticas entre indivíduos, dos efeitos da variância causada por diferenças ambientais entre indivíduos, e dos efeitos da variância causada pela interação genótipo x ambiente (PEREIRA, 2004).

pedigree com o derivado das informações dos marcadores (MISZTAL et al., 2009; AGUILAR et al., 2010; CHRISTENSEN; LUND, 2010). Como forma de aperfeiçoar as metodologias de análise e a eficiência dos processos de avaliação e seleção, é importante que estudos sejam conduzidos para aplicação e comparação dos resultados de diferentes abordagens (CARDOSO et al., 2013).

Além de contribuir para a obtenção de valores genéticos mais acurados, as informações dos marcadores moleculares podem auxiliar também na identificação das regiões cromossômicas chamadas QTL (*Quantitative Trait Loci*, ou *loci* de caracteres quantitativos), que contêm genes que influenciam a expressão de caracteres quantitativos (FALCONER; MACKAY, 1996). As pesquisas que utilizam informações de SNPs espalhados por todo o genoma para investigar possíveis associações entre QTLs e fenótipos da característica de interesse são chamados de estudos de associação genômica ampla – GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), e supõem que uma determinada mutação relacionada ao fenótipo esteja fortemente ligada (em desequilíbrio de ligação) com alguns marcadores (GODDARD; HAYES, 2009). A utilização de métodos estatísticos que permitam identificar tais associações corretamente, eliminando vieses e falsos positivos, é um dos desafios das análises de GWAS (MENEZES et al., 2013).

Diante da importância de aplicação e exploração das novas tecnologias disponíveis, o presente trabalho apresenta inicialmente um breve referencial teórico sobre os principais conceitos e aspectos relacionados à aplicação da genômica em bovinos de corte e à resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Em seguida, são relatados e discutidos os resultados obtidos em dois estudos envolvendo a utilização de dados genômicos em rebanhos das raças Hereford e Braford. Deste modo, o presente trabalho busca contribuir para a disseminação de conhecimento para estudantes, criadores, técnicos e demais profissionais atuantes na área da bovinocultura de corte.

2 Revisão de Literatura

2.1 Genômica no Melhoramento Animal – Conceitos gerais

O objetivo básico de qualquer programa de melhoramento genético é alcançar melhorias em características economicamente importantes nos sistemas produtivos, através do aumento da frequência de alelos ou combinação de alelos favoráveis para estas características nos rebanhos. Para tanto, as ferramentas utilizadas no melhoramento animal (seleção e cruzamentos) são fundamentadas, de forma geral, na escolha dos animais ou raças que produzirão filhos na geração seguinte, ou seja, na decisão de quais indivíduos poderão contribuir com a constituição genética da próxima geração. Assim, a identificação precisa dos animais que possuem os genótipos de interesse é ponto chave para o sucesso do processo (EUCLIDES FILHO, 1999).

A maioria das características relevantes na pecuária de corte é controlada por muitos genes com pequeno efeito individual localizados em várias regiões ao longo dos cromossomos (*loci*). Tais características são denominadas *quantitativas*, e apresentam variação contínua, ou seja, os indivíduos não podem ser facilmente separados em classes distintas, pois existem valores intermediários (NICHOLAS, 2011). Nestas situações o fenótipo do animal não pode ser considerado uma indicação precisa de seu genótipo, devido ao fato de a variação genética em produtividade estar na dependência da variação alélica em um grande número de *loci*, e ao grande efeito de fatores ambientais sobre a expressão gênica destes *loci* (EUCLIDES FILHO, 1999). Estes segmentos cromossômicos que contêm genes que afetam a expressão de características quantitativas são denominados *Quantitative Trait Loci* (QTL) (FALCONER; MACKAY, 1996).

Devido à natureza poligênica, variação contínua e alta influência ambiental sobre as características quantitativas, as avaliações genéticas dos animais são realizadas a partir da análise da variação existente entre os indivíduos (ROSA et al., 2013). Apesar do sucesso obtido pela seleção baseada nas DEPs, os avanços nos conhecimentos em genética molecular e nas ferramentas de biotecnologia têm demonstrado a existência de genes de efeito significativo em características de interesse econômico, e os procedimentos clássicos de avaliação genética já podem ser assistidos por informações obtidas diretamente do material genético dos animais, através dos chamados marcadores moleculares (CARDOSO, 2007). As técnicas baseadas na utilização de marcadores permitem agregar informações à etapa de seleção de genótipos superiores, e estudar as regiões que influenciam a expressão das características para um melhor entendimento dos genes e processos moleculares envolvidos na expressão das mesmas (COLE et al., 2011; PETERS et al., 2012; COSTA et al., 2015; KIM et al., 2015).

Marcadores moleculares são definidos como fragmentos de DNA polimórficos que diferenciam indivíduos geneticamente relacionados, mediante diferenças na sequência do DNA, e que são herdados geneticamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; REGITANO; COUTINHO, 2001). Os marcadores genéticos são resultantes de mutações pontuais que promovem modificações na sequência do DNA e, quando ocorrem em regiões cromossômicas que contêm genes, podem causar alterações nas proteínas codificadas e resultar em variações na expressão fenotípica da característica controlada por estes genes (BORÉM, 2009; FERRAZ et al., 2012; MENEZES et al., 2013).

Os vários tipos de marcadores disponíveis atualmente se diferenciam basicamente pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade presente no DNA, pela habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, facilidade de uso, custos, e consistência de resultados (BORÉM, 2009). Entre os mais utilizados estão os microssatélites (TAUTZ, 1989), formados por uma sequência de até seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, e os marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (COLLINS et al., 1998), que são polimorfismos em um único par de bases, e muito úteis na construção de mapas genéticos de alta resolução devido a sua alta frequência e distribuição homogênea ao longo de todo o genoma (BROOKES, 1999; LI et al., 2009; THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009).

Toda a base do estudo dos marcadores SNP está na estimação, individual ou em conjunto, do efeito de substituição alélica (FERRAZ et al., 2012). Na detecção de regiões cromossômicas que influenciam a expressão das características, as informações fornecidas pelos marcadores podem ser utilizadas basicamente de duas maneiras: na abordagem dos genes candidatos (marcadores diretos) e no mapeamento de QTL (marcadores indiretos).

Na abordagem dos genes candidatos são investigados polimorfismos em genes diretamente relacionados à característica de interesse, de forma que o próprio marcador é o responsável pelas diferenças fenotípicas observadas nos animais (REGITANO; COUTINHO, 2001). Apesar do sequenciamento completo do bovino em 2009 (THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009), os genes relacionados à produtividade, adaptabilidade, qualidade de carne, entre outras características, ainda não estão completamente esclarecidos (YANG et al., 2013).

A possibilidade de construção de mapas de ligação genética (BISHOP et al., 1994; KAPPES et al., 1997) é uma das mais importantes contribuições da tecnologia dos marcadores, pois através destes mapas é possível realizar os estudos de mapeamento de QTL, ou seja, localizar as regiões cromossômicas que controlam características de importância econômica e quantificar o efeito destas sobre as características, informações que são de extrema importância para os programas de melhoramento (TANKSLEY et al., 1993; SONSTEGARD; VAN TASSEL, 2004). Por meio de metodologias estatísticas apropriadas, o mapeamento permite estimar a localização e o efeito do QTL através de testes de associação entre os marcadores genéticos e os dados fenotípicos da característica. Assim, o mapeamento genético permite realizar inferências sem que os genes responsáveis pelo fenótipo sejam conhecidos, investigando polimorfismos/mutações não funcionais que estejam ligados a regiões genéticas de interesse (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; MENEZES et al., 2013).

Além da construção de mapas genéticos saturados, a eficiência do mapeamento de QTL e a determinação da ligação genética entre marcadores e QTL depende da existência do desequilíbrio de ligação (DL) entre alelos do marcador e do QTL (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Alelos que estão fisicamente próximos nos cromossomos não são transmitidos de forma independente à progênie, mas sim como blocos de alelos denominados haplótipos, criando um nível de correlação entre alelos

de diferentes *loci* do genoma, que corresponde ao desequilíbrio de ligação (ARDLIE et al., 2002). Assim, o desequilíbrio de ligação entre dois *loci* ocorre quando as frequências genotípicas dos gametas diferem do produto das frequências dos alelos componentes, indicando a existência de uma associação significativa (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Esta associação não aleatória gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados por análises estatísticas adequadas, sendo usualmente utilizadas para descrever o desequilíbrio de ligação as estatísticas D' (LEWONTIN, 1964) e r^2 (HILL; ROBERTSON, 1968). Comparativamente à estatística D' , o coeficiente r^2 tem sido apontado como mais robusto para estimativas baseadas em marcadores bialélicos, além de requerer menor número de amostras para obtenção de níveis suficientes de acurácia (ARDLIE et al., 2002; KHATKAR et al., 2008; LIPKIN et al., 2009).

Esta correlação entre alelos de diferentes *loci* pode ser provocada também por processos evolutivos e eventos populacionais históricos, como processos naturais de deriva genética, isolamento populacional com aumento das taxas de endogamia e redução do tamanho efetivo da população (REICH et al., 2001; ARDLIE et al., 2002; KHATKAR et al., 2008). A seleção (natural ou artificial) também pode alterar os níveis de DL, aumentando o DL em regiões genômicas afetadas pela seleção, favorecendo o aumento na frequência de certos alelos na população (TEO et al., 2009). Rápida expansão populacional e eventos de recombinação ao longo do tempo promovem a quebra de grande haplótipos e reduzem os níveis gerais de DL na população (HILL; ROBERTSON, 1968; TERWILLIGER et al., 1998; REICH et al., 2001).

Em estudos relacionados à estrutura genética das populações, informações sobre o DL podem ser utilizadas para estimar taxas de recombinação (LI; STEPHENS, 2003; CONRAD et al., 2006), tamanho efetivo de população (TENESA et al., 2007; FLURY et al., 2010), e também para investigar a história da população e eventos demográficos (REICH et al., 2001; FREEMAN et al., 2006; MCEVOY et al., 2011). O conhecimento acerca dos níveis de DL na população é muito importante para aplicação de diversas ferramentas genômicas no melhoramento genético animal, sendo útil, por exemplo, na determinação do número de marcadores necessários para obter resultados consistentes no mapeamento de QTL por DL (MCKAY et al., 2007), na seleção genômica (MEUWISSEN et al., 2001; KHATKAR et al., 2008;

SARGOLZAEI et al., 2008; QANBARI et al., 2010), e em estudos de associação genômica ampla (GOLDSTEIN, 2001; CARLSON et al., 2004a).

Embora ainda existam poucos estudos conduzidos para avaliar os níveis de DL em rebanhos zebuínos, diferenças entre populações *Bos taurus* e *Bos indicus* já foram observadas. De maneira geral, níveis inferiores de DL têm sido relatados em populações de origem zebuína quando comparadas às taurinas, sendo a maior pressão de seleção e o menor tamanho efetivo das populações taurinas apontadas como algumas das possíveis justificativas (THEVENON et al., 2007; ESPIGOLAN et al., 2013; PÉREZ O'BRIEN et al., 2014).

Alguns autores ressaltam que a maioria dos estudos conduzidos até então é baseada em análises de DL utilizando poucos marcadores, sendo consenso entre diversos autores a necessidade de maiores densidades de marcadores como forma de garantir maiores eficiências no mapeamento de QTL e na aplicação de estudos de associação genômica ampla e seleção genômica (KHATKAR et al., 2008; MCKAY et al., 2007; QANBARI et al., 2010). Diante disso, é fundamental o conhecimento acerca deste parâmetro em rebanhos onde serão aplicadas algumas destas ferramentas, pois diferenças no desequilíbrio de ligação entre populações de mesma espécie ocorrem e podem alterar a repetibilidade de resultados encontrados em estudos de associação e comprometer a eficiência de aplicação da seleção genômica ou assistida por marcadores em populações diferentes das utilizadas nas análises iniciais (ANDREESCU et al., 2007; GAUTIER et al., 2007; AMARAL et al., 2008; DE ROOS et al., 2008; MEADOWS et al., 2008; UIMARI AND TAPIO, 2011).

2. 2 Seleção Genômica

Tradicionalmente, a obtenção das estimativas de valores genéticos é baseada na metodologia dos modelos mistos, que utilizam registros fenotípicos e de pedigree para obtenção de predições BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*) (HENDERSON, 1975). A possibilidade de incorporação de informações adicionais fornecidas por marcadores moleculares na predição do mérito genético e na seleção de indivíduos foi inicialmente proposta por Meuwissen et al. (2001), através do processo

denominado seleção genômica. Conceitualmente, a seleção genômica pode ser definida como a seleção simultânea para milhares de marcadores cobrindo densamente todo o genoma, de tal forma que todos os genes estejam muito próximo de, pelo menos, alguns desses marcadores (MENEZES et al., 2013).

Os pioneiros na aplicação efetiva da ferramenta foram criadores de gado Holandês nos Estados Unidos, onde estimativas dos valores genéticos genômicos (GEBV - *genomic estimated breeding values*) são apresentadas nas avaliações genéticas dos animais desde 2008. Em abril de 2011, a base de dados de animais genotipados com o BovineSNP50 já contava com mais de 85.000 bovinos, proporcionando ganhos médios de 35% na confiabilidade das avaliações de touros jovens para características produtivas (VAN TASSELL, 2011), gerando resultados favoráveis relacionados à redução no intervalo entre gerações e aumento do progresso genético (HUTCHISON et al., 2014). Frente aos promissores resultados observados na bovinocultura leiteira, é crescente o número de estudos que investigam a aplicação da seleção genômica em bovinos de corte e que buscam otimizar a acurácia dos parâmetros estimados, considerando as características deste sistema de produção.

A implementação da seleção genômica compreende basicamente três etapas: (1) a genotipagem de uma população referência, contendo registros de fenótipos, com conjuntos de marcadores em média ou alta densidade e posterior estimativa dos efeitos dos SNP ou haplótipos; (2) a validação dos efeitos estimados em um grupo de animais que não pertence à população referência; (3) e a predição dos valores genéticos de indivíduos candidatos à seleção, baseados nos genótipos dos marcadores e nos efeitos estimados (HAYES et al., 2009). Quanto maior for a população referência, mais acuradas serão as estimativas de GEBV nos animais candidatos à seleção (MEUWISSEN et al., 2001; DAETWYLER et al., 2008; VANRADEN et al., 2009). A acurácia das estimativas de GEBV também é influenciada pela herdabilidade da característica de interesse, pelo grau de parentesco entre a população referência e os animais candidatos à seleção, e pelo nível de desequilíbrio de ligação entre marcadores e QTLs (MEUWISSEN et al., 2001; DAETWYLER et al., 2008; HABIER et al., 2010; WIENTJES et al., 2013).

Na última década, avanços tecnológicos têm permitido a genotipagem de um grande número de marcadores SNP no genoma. As principais tecnologias disponíveis

atualmente em bovinos de corte são o chip de genotipagem da Illumina (BovineSNP50), lançado em 2007, com capacidade de genotipar 54.609 marcadores e, lançados mais recentemente, os painéis de alta densidade (HD - *High Density*), Illumina High-Density Bovine BeadChip Array (777.962 SNP) e Affymetrix Axiom Genome Wide BOS 1 Array (648.874 SNP). Este aumento na densidade de marcadores genotipados tem contribuído para obtenção de estimativas dos valores genéticos genômicos e dos efeitos de marcadores mais acuradas, aumentando, assim, a eficiência de processos de seleção genômica e de estudos de associação ampla do genoma, respectivamente (SOLBERG et al., 2008; HAYES et al., 2009).

Embora os custos de genotipagem tenham reduzido drasticamente nos últimos anos, a genotipagem em alta densidade de todo o rebanho como forma de aumentar a acurácia das estimativas e a eficiência da seleção genômica ainda é uma prática financeiramente inviável (BOISON et al., 2015). Uma alternativa que tem sido apresentada como forma de redução destes custos é a imputação de genótipos (BOICHARD et al., 2012; HUANG et al., 2012; KHATKAR et al., 2012; CARVALHEIRO et al., 2014). A imputação permite inferir sobre os marcadores não genotipados em indivíduos avaliados com chips de baixa ou média densidades, a partir de informações fornecidas por uma população referência genotipada com chips de alta densidade (HOWIE et al., 2009; HAYES et al., 2012), e a eficácia de sua aplicação tem sido objetivo de estudo em diferentes espécies animais (ZHANG; DRUET, 2010; CORBIN et al., 2014; HEIDARITABAR et al., 2015; UEMOTO et al., 2015; XIANG et al., 2015).

Os métodos de imputação podem ser basicamente divididos em dois grupos: métodos que se baseiam no desequilíbrio de ligação e na frequência alélica para a reconstrução de haplótipos (como o implementado pelos programas Impute2 (HOWIE et al., 2009), Beagle (BROWNING; BROWNING, 2007), MaCH (LI et al., 2010)), e métodos baseados em algoritmos que também utilizam informações de pedigree (como, por exemplo, AlphaImpute (HICKEY et al., 2011), Findhap (VANRADEN et al., 2011), DAGPHASE (DRUET; GEORGES, 2010), FImpute (SARGOLZAEI et al., 2014)).

A acurácia da imputação pode ser afetada pelo tamanho efetivo e composição genética de indivíduos da população referência utilizados para a reconstrução de haplótipos, pela frequência alélica dos marcadores, e por diferenças entre a densidade de marcadores na população referência e na população alvo da imputação (BADKE

et al., 2013; MA et al., 2013; BRØNDUM et al., 2014; SARGOLZAEI et al., 2014; ROSHYARA; SCHOLZ, 2015). Em bovinos de corte, os valores de acurácia têm sido descritos como inferiores aos obtidos em rebanhos leiteiros, o que pode ser atribuído a fatores como menor número de animais disponíveis na população referência e menor grau de parentesco entre a população referência e a imputada (HOZÉ et al., 2013).

Além da evolução observada na área da biologia molecular, avanços significativos na área da bioinformática e em termos de capacidade de processamento computacional também são fatores essenciais que têm contribuído para o desenvolvimento de estudos sobre aplicação da genômica na produção animal, permitindo a manipulação do expressivo volume de dados gerados pelas técnicas de sequenciamento em larga escala e genotipagem (RESENDE et al., 2010). Estes desenvolvimentos tecnológicos têm possibilitado a utilização de metodologias mais sofisticadas para a incorporação e avaliação dos dados genômicos, e atualmente há uma grande variedade de métodos e ferramentas disponíveis para implementação dos conceitos de avaliação e seleção genômica (NICOLAZZI et al., 2015).

Na seleção genômica, os valores genéticos dos indivíduos candidatos à seleção são estimados utilizando a informação fornecida por milhares de marcadores espalhados por todo o genoma, baseando-se na divisão do genoma em segmentos cromossômicos definidos por marcadores adjacentes e na estimação dos efeitos destes marcadores ou haplótipos simultaneamente (MEUWISSEN et al., 2001; HAYES et al., 2009). O modelo conceitual elementar para estimar os efeitos de marcadores e valores genéticos genômicos pode ser representado por:

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^{nHap} x_{ij}g_j + e_i ,$$

onde y_i = fenótipo observado do animal i ; μ = média geral; x_{ij} = variável indicadora que relaciona o efeito do haplótipo g_j ao fenótipo observado do animal i ; e_i = erro aleatório. O valor genômico de um determinado animal i pode ser predito simplesmente somando-se as estimativas dos efeitos dos haplótipos (ou marcadores) disponíveis:

$$\hat{u}_i = \sum_{j=1}^{nHap} x_{ij}\hat{g}_j .$$

A aplicação de modelos matemático-estatísticos apropriados ao conjunto de dados disponível é fundamental para a obtenção de estimativas acuradas (JOSAHKIAN, 2013). Neste sentido, diferentes modelos para estimação dos efeitos de haplótipos ou de marcadores nos segmentos cromossômicos têm sido propostos. Entre as metodologias disponíveis atualmente para as predições genômicas, podem ser citados os métodos GBLUP (*Genomic Best Linear Unbiased Prediction*), RR-BLUP (*Random "Ridge" Regression-Best Linear Unbiased Prediction*) (WHITTAKER et al., 2000; MEUWISSEN et al., 2001), LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) (TIBSHIRANI, 1996), e os métodos bayesianos, que fornecem várias possibilidades de análise através do chamado "alfabeto Bayesiano": BayesA, BayesB, BayesC, BayesCπ, entre outros (MEUWISSEN et al., 2001; GIANOLA et al., 2009; MEUWISSEN, 2009; HABIER et al., 2011).

De maneira geral, os diferentes métodos diferem nas pressuposições acerca das variâncias dos efeitos de marcadores. O método GBLUP, por exemplo, considera que os efeitos de QTL apresentam distribuição normal com variância constante ao longo dos segmentos cromossômicos, ou seja, assume um modelo infinitesimal com muitos *loci* de pequenos efeitos, estimando assim todos os efeitos alélicos simultaneamente (RESENDE et al., 2010). Os métodos bayesianos assumem a ocorrência de muitos genes com pequenos efeitos, e de poucos genes com grandes efeitos. Estes métodos assumem, *a priori*, que muitos marcadores terão efeito zero, reduzindo o tamanho do genoma e atribuindo efeitos mais expressivos a menos marcadores ou grupos de marcadores (HABIER et al., 2011). O melhor método de predição genômica pode ser considerado aquele que melhor refletir a natureza biológica da característica analisada em termos de efeitos gênicos (RESENDE et al., 2010).

As diferentes estratégias de combinação dos resultados fornecidos pelas avaliações genômicas com os resultados das avaliações genéticas tradicionais vêm sendo avaliadas por programas de melhoramento no Brasil e no mundo (CARDOSO et al., 2013). Entre os procedimentos testados e comparados estão as abordagens que consideram as informações fornecidas pelos marcadores como uma característica correlacionada com as demais para obtenção das DEPs, e os procedimentos multipassos (*multistep*) ou de passo único (*single-step*).

A estratégia de utilizar informações dos marcadores genéticos, disponibilizadas como valores genéticos moleculares (VGM), como uma nova característica correlacionada geneticamente com as demais para obtenção de DEPs aprimoradas pela genômica foi inicialmente adotada na avaliação de características de carcaça, entre outras, de rebanhos da raça Angus nos Estados Unidos (MACNEIL et al., 2010). Após os pioneiros trabalhos nesta raça, outras raças de corte nos Estados Unidos mostraram interesse em usufruir desta tecnologia, e também relataram resultados satisfatórios (SAATCHI et al., 2012, 2013).

Nos procedimentos multipassos, as DEPs são obtidas através de análises tradicionais baseadas em dados de fenótipo e pedigree, e um Valor Genômico Direto (VGD) é obtido com base nas equações de predição (através das informações de fenótipos e genótipos) separadamente. Em seguida ambas as fontes de informação (DEP e VGD) são combinadas por meio de diferentes índices ponderados para gerar as chamadas DEPs Genômicas (DEPG), considerando a acurácia das estimativas obtidas e a herdabilidade da característica (VANRADEN et al., 2009; HAYES et al., 2009).

No procedimento de passo único proposto por Misztal et al. (2009), toda a informação genômica, fenotípica e de pedigree é combinada em um único passo para predição simultânea dos valores genéticos genômicos. Nessa abordagem, uma matriz de parentesco **G** é criada utilizando as informações dos marcadores, em contraste com o método BLUP clássico, no qual a matriz de parentesco **A** contém apenas as informações de pedigree. No procedimento de *single-step*, as matrizes **G** e **A** são combinadas em uma matriz denominada **H** (LEGARRA et al., 2009; CHRISTENSEN; LUND, 2010), que contém as informações de animais genotipados e não genotipados. Os procedimentos *single-step* GBLUP têm sido testados em diferentes espécies (CHEN et al., 2011; FORNI et al., 2011), apresentando resultados satisfatórios em termos de melhorias na acurácia de predições (CHRISTENSEN et al., 2012; GAO et al., 2012).

Um fator crítico para predição de DEPs acuradas é a determinação correta do parentesco entre indivíduos. Erros em registros de genealogia podem influenciar sobremaneira a acurácia de estimativas de valores genéticos, comprometendo, conseqüentemente, o potencial do progresso genético (DODDS et al., 2005; MUNOZ et al., 2015). Nesse sentido, a genômica pode contribuir para a acurácia das

estimativas por permite a correção de inconsistências no pedigree. A tecnologia genômica permite, ainda, a utilização de lotes de reprodutores múltiplos, pois a paternidade pode ser determinada após o nascimento dos animais (MENEZES et al., 2013).

Na metodologia BLUP, a matriz **A** que relaciona geneticamente todos os animais leva em conta a proximidade genética entre os indivíduos para atribuir a proporção de genes compartilhados. Considera-se, por exemplo, que o parentesco entre pai e filho seja de 50%, sob a suposição de que o animal herda metade de genes do pai e metade da mãe. Entre irmãos completos, o parentesco atribuído também corresponde a 50%, enquanto que entre meios irmãos é de 25%, e assim por diante. Assim, as soluções das equações de modelos mistos consideram a proporção de genes em comum entre os animais como forma de aumentar a acurácia das estimativas dos valores genéticos, além de permitir a predição de valores genéticos de animais que não foram avaliados fenotipicamente, a ligação genética entre grupos de contemporâneos e a comparação entre animais de diferentes gerações (PEREIRA, 2004).

Apesar da inclusão da matriz **A** nas avaliações genéticas ter representado um grande avanço para as análises no melhoramento animal, a genômica pode contribuir também para tornar as estimativas de parentesco entre animais mais precisas. Isso porque a matriz de parentesco tradicional ignora os efeitos da amostragem mendeliana que ocorre durante a gametogênese e resulta em variação na proporção de genes em comum entre animais aparentados (AVENDAÑO et al., 2005). Desta forma, irmãos completos podem ser mais (ou menos) semelhantes caso compartilhem mais (ou menos) alelos dos pais, e, nestes casos, o parentesco entre eles será superior (ou inferior) a 50% (MENEZES et al., 2013). Através da genômica é possível “rastrear” os alelos que cada animal recebeu, contribuindo, assim, para aumentar a acurácia das estimativas dos valores genéticos.

De forma geral, as vantagens da seleção genômica em relação à seleção convencional (baseada apenas em fenótipos e dados de pedigree) podem ser concentradas em três principais pontos: (1) uso da matriz de parentesco real e própria de cada característica, o que aumenta a acurácia de seleção; (2) possibilidade de seleção precoce dos animais, que se reflete em maior ganho genético por unidade de tempo; (3) utilização de mais informações (combinando dados fenotípicos, genotípicos

e genealógicos) para correção de dados e realização das análises genômicas, o que aumenta a acurácia das estimativas (RESENDE et al., 2010).

2.3 Estudos de Associação Genômica Ampla

Além de contribuir para a estimação dos valores genéticos para a seleção genômica, as informações fornecidas pelos marcadores moleculares podem ser utilizadas também no processo de identificação de regiões do genoma relacionadas com a expressão das características de interesse. A identificação de mutações ao longo do genoma permite realizar o detalhamento das regiões onde elas ocorrem, investigando o potencial papel destas mutações na regulação da expressão gênica (ASHAN et al., 2013). A descoberta dos genes que afetam a expressão das características possibilitaria aumentar os ganhos genéticos obtidos em programas de melhoramento, selecionando-se diretamente indivíduos portadores de alelos favoráveis (MEUWISSEN; GODDARD, 1996; FRISCH et al., 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos para detecção de polimorfismos em genes com efeitos sobre características produtivas foram conduzidos com base na abordagem dos genes candidatos, que investiga os genes envolvidos na expressão da característica para definir se a ocorrência de polimorfismos nestes genes está relacionada com variações fenotípicas na população (ZHU; ZHAO, 2007). Assim, genes candidatos são genes de ação biológica conhecida, envolvidos no desenvolvimento ou na fisiologia de uma característica de interesse econômico, e sua utilização como ferramenta de seleção se baseia no conhecimento prévio dos mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características na tentativa de identificar variações/mutações em genes específicos (enzimas, hormônios ou proteínas) entre indivíduos que apresentem fenótipos distintos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; NICHOLAS, 2011). Um exemplo da aplicação bem sucedida desta estratégia é a identificação e seleção de animais com mutações no gene da miostatina, associadas à formação da musculatura dupla em diferentes raças (GROBET et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997; KARIN et al., 2000). A

estratégia de genes candidatos, no entanto, é limitada devido ao pouco conhecimento disponível sobre as funções de todos os genes (COUTINHO et al., 2010).

Outra estratégia de detecção de genes relacionados a características produtivas é o mapeamento de QTLs baseado na identificação de regiões cromossômicas associadas à variação genética da característica. Essa identificação depende do desenvolvimento de mapas genéticos saturados por marcadores polimórficos e de uma estrutura populacional que apresente segregação para a característica estudada (COUTINHO et al., 2010). A maior restrição desta abordagem é que ela indica a região do genoma que possivelmente contém os genes associados à característica, mas esta região pode ser muito extensa e conter diversos genes, dificultando a identificação das mutações causais envolvidas nas diferenças fenotípicas (GODDARD; HAYES, 2009).

Muitos estudos têm sido realizados na busca por QTLs, analisando regiões cromossômicas que possam estar associadas a características de importância econômica em bovinos. Até a presente data, o CattleQTLdb (HU et al., 2013) apresenta 36,693 QTL mapeados para 492 características diferentes e descritos por 623 publicações. Deste total, 10.475 QTLs são associados a características do leite, 8.553 à características de exterior, 6.293 à produção, 5.916 à reprodução, 3.362 à qualidade de carne e carcaça, e 2.094 à sanidade. A maioria dos QTLs identificados foram mapeados por análises de ligação, mas a atual disponibilidade de chips de SNPs de alta densidade e a possibilidade de conduzir estudos de associação ampla no genoma (GWAS) têm permitido a identificação mais precisa das regiões genômicas e de marcadores associados com características quantitativas (GODDARD; HAYES, 2009; ZHANG et al., 2015).

Os estudos de associação genômica ampla (GWAS) utilizam uma grande quantidade de marcadores espalhados por todo o genoma para identificar possíveis associações entre regiões cromossômicas e os fenótipos de interesse, e supõem que uma determinada mutação relacionada à expressão da característica esteja fortemente ligada (em desequilíbrio de ligação) com alguns marcadores (MENEZES et al., 2013). Para execução dos GWAS, inicialmente uma população de indivíduos com registros fenotípicos é genotipada, sendo importante ressaltar, neste ponto, que a densidade de marcadores utilizada deve ser "calibrada" de acordo com os níveis de desequilíbrio de ligação na população, para garantir que QTLs com grandes efeitos

não deixem de ser detectados por estarem além do alcance do desequilíbrio de ligação dos marcadores mais próximos (TIZIOTO et al., 2013). Outra importante questão é a existência de fenótipos bem definidos e confiáveis, sendo que o tamanho amostral da população fenotipada deve ser suficientemente grande para detectar até mesmo pequenas associações com os marcadores, pois polimorfismos que explicam até 1% do fenótipo podem ser efetivos no esclarecimento de suas bases biológicas (MENEZES et al., 2013).

Os estudos de GWAS apresentam maior poder de detecção de QTL comparados aos estudos de ligação devido à alta densidade de marcadores que permitem promover o mapeamento fino de QTLs, para delimitar a menor região cromossômica em que um QTL foi mapeado (CARLSON et al., 2004b; CORDELL; CLAYTON, 2005; SAHANA, et al. 2010). De acordo com Goddard e Hayes (2009), os progressos na identificação de genes que afetam as características complexas têm sido lentos pois os estudos de ligação fornecem intervalos de confiança muito extensos para indicar a localização do QTL. Apesar dos aprimoramentos tecnológicos na biologia molecular, a descrição da arquitetura genética das características de interesse econômico, determinando quais e quantos genes contribuem para a expressão do fenótipo, e também como interagem, ainda é um procedimento complexo, devido à natureza quantitativa das características produtivas, controladas por muitos genes com pequeno efeito cada (COUTINHO et al., 2010).

Um dos fatores determinantes para o sucesso de análises de GWAS também consiste na utilização de métodos estatísticos adequados, que permitam detectar as associações sem vieses, descartando as associações consideradas falsas (MENEZES et al., 2013). Os resultados satisfatórios em termos de melhorias na acurácia de predições observados com a aplicação do procedimento ssGBLUP (*single-step genomic BLUP*) em alguns estudos de seleção genômica (CHRISTENSEN et al., 2012; GAO et al., 2012), criam expectativas sobre sua aplicação em GWAS como forma de contribuir para maiores acurácias no processo de identificação das regiões cromossômicas associadas a características de interesse. A aplicação de métodos bayesianos em GWAS também vêm sendo investigada, e algumas comparações entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias já foram descritas (WANG et al., 2012; 2014; VAN DEN BERG et al., 2013).

Apesar do método ssGBLUP apresentar vantagens em relação aos métodos multipassos (AGUILAR et al., 2010; CHEN et al., 2011; FORNI et al., 2011), ele se baseia em um modelo infinitesimal, que assume que todos os SNP possuem um pequeno efeito. A vantagem deste modelo é que a matriz de parentesco resultante é idêntica para todas as características dentro de uma população (AGUILAR et al., 2010). Os métodos BayesA e BayesB apresentam como vantagem o fato de não assumirem a pressuposição de mesma variância para os efeitos de todos os SNP, o que, em contrapartida, demanda maior tempo de processamento computacional. Além disso, não permitem a inclusão de informações de indivíduos com registros de fenótipos mas não genotipados (WANG et al., 2012).

Diante disso, Wang et al. (2012) propuseram um método de ssGBLUP que combina as informações de fenótipo, genótipo e pedigree, atribuindo pesos aos efeitos dos marcadores, de acordo com sua suposta relevância para a característica. Esta estratégia, denominada wssGBLUP (*weighted single-step GBLUP*), não restringe a incorporação dos dados de animais não genotipados e não exige a inclusão de pseudo-fenótipos. Comparando os resultados de diferentes metodologias para GWAS em frangos de corte, Wang et al. (2014) relataram que, de maneira geral, todos os métodos apresentam alguma desvantagem, estando suas eficiências sob influência de fatores como a proporção de marcadores que explicam a variância genética da característica, e do número de animais com dados de fenótipo e genótipo disponíveis.

2. 4 Resistência genética de bovinos ao carrapato

No Brasil, a alta prevalência de infestações parasitárias é responsável por grandes perdas econômicas, destacando-se as causadas pelo carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os efeitos diretos do parasitismo se refletem em redução no ganho de peso e produção leiteira, depreciação do couro devido às lesões cutâneas que facilitam a ocorrência de miíases, e possibilidade de transmissão de patógenos associados à anaplasmose e à babesiose (JONSSON, 2006; JONSSON; PIPER, 2007). Somam-se a estes prejuízos as perdas indiretas, relacionadas aos gastos com equipamentos, instalações e mão de obra dispensados com o tratamento

de animais doentes e com o controle químico do parasita (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; JONSSON et al., 2008; RECK et al., 2014b). Estima-se que os prejuízos causados nos rebanhos nacionais sejam da ordem de US\$ 3,24 bilhões ao ano (GRISI et al., 2014).

Apesar de algumas alternativas para seu controle já terem sido propostas (RODRÍGUEZ VALLE et al., 2004; WILLADSEN, 2006; LEEMON et al., 2008; SAMISH et al., 2008), a utilização exclusiva de químicos ainda representa o principal método de controle do carrapato nas propriedades (FRAGA et al., 2003). Além de aumentar o custo de produção, o uso de carrapaticidas pode resultar em resíduos na carne e no meio ambiente e tem se apresentado cada vez menos eficiente como método de controle a longo prazo, frente aos crescentes relatos de aquisição de resistência dos parasitas a diversos princípios ativos (FRISCH, 1999; MARTINS; FURLONG, 2001; ANDREOTTI et al., 2011; RECK et al., 2014a; CRUZ et al., 2015). Diante deste cenário, é necessário o estabelecimento de programas integrados de controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, combinando diferentes estratégias de controle para minimizar os efeitos deletérios ocasionados pelo parasitismo e ao mesmo tempo adiar o desenvolvimento e disseminação da resistência dos parasitas aos carrapaticidas. Entre os métodos complementares propostos está a criação de animais geneticamente mais resistentes ao carrapato (SUTHERST; UTECH, 1981; FRISCH et al., 2000).

Desde a sua introdução definitiva no Brasil no início do século XX, a grande capacidade de adaptação das raças zebuínas (*Bos indicus*) às condições climáticas brasileiras garantiu sua ampla utilização pelos criadores, de forma que atualmente cerca de 80% do rebanho é formado por animais de origem zebuína (ABIEC, 2015). Na pecuária, pode-se definir o termo adaptação como a aptidão manifestada por um determinado genótipo de se ajustar às condições ambientais sem o comprometimento, ou com o menor comprometimento possível, de suas características produtivas (TURNER, 1980). Bovinos de origem taurina (*Bos taurus*), mais exigentes nutricionalmente e menos adaptados a ambientes adversos, encontraram na região Sul do Brasil, caracterizada pelo clima mais frio e pastagens com maior valor nutritivo, condições mais favoráveis para seu desenvolvimento. Comparativamente aos zebuínos, animais *Bos taurus* apresentam maior potencial de crescimento, maior precocidade e melhor acabamento de carcaça (EUCLIDES FILHO, 1997).

Devido às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento e sobrevivência do carrapato nos campos, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país os animais são expostos ao parasitismo durante todo o ano (FURLONG et al., 2003), e a maior resistência de zebuínos às infestações é uma das características adaptativas destas raças que estimula sua exploração comercial nestas áreas. Apesar de minimizar os impactos decorrentes dos altos níveis de infestação, esta prática acaba se opondo ao que poderia ser uma alternativa para incrementar a produtividade de muitos rebanhos, aumentando a participação de raças taurinas nos plantéis e tirando proveito da complementariedade entre raças para melhorar características como as relacionadas à qualidade da carne, por exemplo. Se consideramos que metade dos rebanhos nacionais se concentra nestas regiões, e que os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e São Paulo lideram há anos o ranking nacional de abates (IBGE, 2015), torna-se ainda mais promissora a possibilidade de expandir a criação de animais *Bos taurus* e seus cruzamentos para aumentar a competitividade do setor.

A maior tolerância de animais *Bos indicus* em relação a *Bos taurus* é amplamente reportada, e estudos envolvendo cruzamentos entre animais destes grupos apontam, inclusive, proporcionalidade entre o número de genes zebuínos e o grau de resistência dos hospedeiros (LEMOS et al., 1995; SANTOS JR. et al., 2000; AYRES et al., 2009). O procedimento clássico de avaliação genética para a resistência ao carrapato envolve a exposição dos animais a infestações naturais ou artificiais, e posteriormente a contagem dos parasitas no corpo dos animais (VILLARES, 1941; WILKINSON, 1955; WHARTON; UTECH, 1970). A partir destes registros fenotípicos e das informações de pedigree são calculados os parâmetros genéticos da característica, e gerados os valores genéticos e DEPs que são utilizados para orientar os produtores no sentido de identificar os indivíduos superiores genericamente.

Estudos indicam que os diferentes níveis de resistência de bovinos podem afetar não apenas o número de carrapatos que consegue se desenvolver até a fase adulta nos hospedeiros, mas também algumas características de desenvolvimento do parasita. Parâmetros fisiológicos dos ixodídeos que podem ser comprometidos estão relacionados ao tamanho e eficiência reprodutiva das teleóginas, como diminuição no peso, produção e viabilidade de ovos, desprendimento prematuro, dificuldade em realizar a muda, redução nas taxas de fecundidade e eclodibilidade e morte de fêmeas

ingurgitadas (OBEREM, 1984; MARADAY; GONZALES, 1984; BARRIGA et al., 1993; WIKEL, 1996; BIEGELMEYER et al., 2015). Assim, além de representar maiores gastos ao produtor, seja pelo desempenho produtivo reduzido ou pela maior demanda por tratamentos, a permanência de animais vulneráveis às infestações nos rebanhos implica ainda maiores níveis de infestação ambiental, perpetuando a alta incidência de carrapatos na propriedade.

Variações genéticas quanto à resistência também têm sido detectadas entre animais de mesma raça, e trabalhos que visam estimar parâmetros genéticos para a característica em rebanhos de diversas composições genéticas relatam, em geral, herdabilidades com baixas a moderadas magnitudes (BURROW, 2001; FRAGA et al., 2003; PRAYAGA; HENSHALL, 2005; BUDELI et al., 2009; BIEGELMEYER, 2012; AYRES et al., 2015; PASSAFARO et al., 2015). Apesar destas estimativas permitirem a obtenção de ganhos genéticos (ainda que lentos) com a utilização da resistência ao carrapato como critério de seleção, respostas mais consistentes para o progresso desta característica podem ser esperadas através do uso das informações fornecidas pelos marcadores moleculares (NIETO et al., 2013).

A ocorrência de genes de efeitos maior para resistência ao carrapato, que poderiam ser explorados no processo de seleção de animais resistentes, já foi sugerida em alguns estudos. Um destes genes foi identificado em bovinos da raça sintética Adaptur, produtos do cruzamento entre Hereford e Shorthorn. De acordo com Kerr et al. (1994), vários anos de seleção demonstraram que o número médio de parasitas em animais com 0, 1 ou 2 cópias do gene foi de 128, 36 e 7, respectivamente, demonstrando a potencialidade da utilização de genes de grande efeito no processo de seleção. Apesar de este gene controlar uma proporção expressiva da variação genética para a resistência, um estudo posterior na raça demonstrou a natureza poligênica da característica (HENSHALL, 2004).

A despeito da importância assumida pelos transtornos causados pelo parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ainda existem poucos resultados sobre marcadores para resistência a este ectoparasita, o que pode explicado pela dificuldade de identificação em larga escala de indivíduos resistentes, e pelo fato de se tratar de um problema expressivo apenas em países de climas tropicais e subtropicais. Entre os genes do sistema imunológico associados à resistência dos hospedeiros mais estudados estão os genes do complexo maior de

histocompatibilidade (*bovine lymphocyte antigen* - BoLA). Localizados no cromossomo 23, estes genes codificam glicoproteínas de superfície celular que atuam como receptores nas células apresentadoras de antígenos, acoplando e apresentando peptídeos antigênicos para os LT, responsáveis pelo início da resposta imune (TIZARD, 2008). Desta forma, variações nos genes de classe I e II deste complexo poderiam influenciar a capacidade imune dos animais, e os mecanismos de resistência e desenvolvimento da resposta imunológica poderiam ser elucidados a partir da compreensão da expressão destes genes. Associações significativas entre resistência ao carrapato e alelos do gene BoLA-DRB3.2 já foram relatadas por Acosta-Rodríguez et al. (2005), Martinez et al. (2006) e Untalan et al. (2007), confirmando que há evidência científica suficiente suportando a função destes *loci* na expressão da resistência.

Nos últimos anos, estudos de ligação e de associação ampla do genoma foram realizados para realizar varreduras nos cromossomos de bovinos em busca da identificação de regiões com efeito significativo sobre a resistência. Estudos desenvolvidos por Gasparin et al. (2007), Regitano et al. (2008) e Machado et al. (2010) buscaram identificar QTLs para resistência ao carrapato em animais Gir x Holandês através da varredura do genoma com marcadores microsatélites, detectando QTLs nos cromossomos 2, 5, 7, 10, 11, 14, 23 e 27. Em um estudo de associação utilizando SNPs realizado por Barendse (2007), um grande número de polimorfismos de base única associados à característica de resistência foi observado em diversas regiões genômicas. Também em um estudo de associação com SNPs, Turner et al. (2010) demonstraram a ocorrência de uma baixa correlação entre os efeitos dos alelos envolvidos com a produção de leite e com a contagem de carrapatos, indicando que uma seleção pela característica de resistência provavelmente não prejudicaria a produção leiteira do rebanho.

Utilizando os genótipos dos marcadores que foram associados de forma significativa à contagem de carrapatos nos trabalhos de Barendse (2007) e Turner et al. (2010), e complementando com marcadores adicionais localizados nas mesmas regiões genômicas, Porto Neto et al. (2010; 2011) confirmaram QTLs identificados nos cromossomos 3 e 10 em bovinos leiteiros e na raça Brahman. Foram identificados genes candidatos em algumas regiões, mas análises posteriores demonstraram que nenhum destes genes estava relacionado com a expressão de resistência. A

compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na resistência de bovinos e o conhecimento das regiões cromossômicas que afetam esta característica podem contribuir para a seleção mais acurada de indivíduos geneticamente resistentes.

3 Projeto de Pesquisa

Estudo da associação de polimorfismos em genes relacionados à resistência de bovinos ao carrapato

Responsável/Executora: Patrícia Biegelmeyer (Méd. Vet., MSc., Doutoranda)

Orientador: Fernando Flores Cardoso, *Ph.D (Embrapa Pecuária Sul)*

Co-orientador:

Nelson José Laurino Dionello, *Dr. (DZ/FAEM/UFPel)*

Colaboradores:

Claudia Cristina Gulias Gomes, *Dr^a. (Embrapa Pecuária Sul)*

Luciana Correia de Almeida Regitano, *Dr^a. (Embrapa Pecuária Sudeste)*

Vanerlei Mozaquatro Roso, *Ph.D (Gensys Consultores Associados S/C Ltda)*

**Parecer favorável pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
sob o número de registro 6849.**

Pelotas, julho de 2012.

3.1 Caracterização do Problema

Entre as principais causas de perdas produtivas nos sistemas de produção de bovinos dos países tropicais e subtropicais está o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um ácaro hematófago distribuído em todo território nacional, que provoca diminuição de desempenho pelo hematofagismo, desvalorização do couro, altos gastos com insumos e transmissão de outros agentes etiológicos. O carrapato é também o principal limitante da expansão da criação de bovinos puros e cruzados com raças de origem britânica na vasta região tropical do país, que seria uma estratégia para melhorar rapidamente a qualidade da carne de populações zebuínas em sistemas de cruzamentos e pela formação de bovinos compostos. A viabilidade dessa alternativa em larga escala é limitada exatamente pela maior suscetibilidade de animais *Bos taurus* a infestações por carrapatos quando comparados a animais *Bos indicus*, enquanto animais cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus* apresentam suscetibilidade intermediária (FRISCH, 1999).

O uso repetido de tratamentos com acaricidas para controle do carrapato em populações mais susceptíveis tem historicamente gerado o aparecimento de resistência desse parasito aos princípios ativos, gerando grandes despesas com tratamentos ineficazes e a necessidade de altos investimentos para descoberta de novas drogas. Por outro lado, embora os bovinos sejam capazes de desenvolver uma resposta imunológica após exposições sucessivas a carrapatos (DOSSA et al., 1996), o desenvolvimento de vacinas não foi totalmente bem-sucedido por causa da grande habilidade dos parasitas em modular o sistema imune do hospedeiro (BROSSARD; WIKEL, 2004). Desta forma, o emprego de vacinas somente teve sucesso em casos em que já existia alta resistência dos bovinos e a infestação foi baixa (FRISCH, 1999).

Não obstante, a existência de variabilidade genética para resistência ao carrapato tem sido verificada, demonstrando que há potencial para o melhoramento dessa característica nos bovinos (OLIVEIRA et al., 1989; GOMES, 1992; VERÍSSIMO et al., 1997), evitando o uso frequente de acaricidas e seus consequentes problemas de segurança alimentar por resíduos químicos na carne, de desenvolvimento de resistência do parasito aos princípios ativos e os elevados custos dos tratamentos. Portanto, o conhecimento do grau de resistência dos indivíduos dentro de uma mesma

raça, entre raças diferentes e indivíduos cruzados torna-se importante alternativa para a implantação de práticas de melhoramento dos rebanhos. Além disso, a identificação de genes responsáveis pela resistência deve contribuir para aumentar a eficiência da seleção (MACHADO et al., 2010). A criação de animais geneticamente mais resistentes reduzirá o uso de tratamentos carrapaticidas e de resíduos químicos, evitando problemas comerciais e de saúde ambiental e pública. Frente ao recorrente desenvolvimento de resistência do carrapato aos princípios ativos acaricidas e a ausência de alternativas eficazes de controle, aumentar a resistência do hospedeiro tem sido apontada como a única solução definitiva para o problema (FRISCH, 1999).

A contagem de carrapatos ao sobreano vem sendo utilizada desde 2001 como critério de seleção dos rebanhos da Conexão Delta G, uma associação de criadores de Hereford, Braford e Nelore com fazendas em sete estados do país (Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo) envolvendo aproximadamente 290.000 cabeças e que tem por objetivo desenvolver um programa de melhoramento genético para obter e propagar animais geneticamente superiores e mais produtivos, gerando maiores ganhos na atividade pecuarista (CONEXÃO DELTA G, 2007). Foi observada uma herdabilidade moderada para a resistência a carrapatos nos rebanhos desses criadores (CARDOSO et al., 2006; BIEGELMEYER et al., 2011), que, atualmente, buscam melhorar seus processos de coleta de dados e incrementar o ganho genético nessa característica através da inovação tecnológica, viabilizada pela cooperação com instituições de ciência e tecnologia que desenvolvem pesquisas em parasitologia e melhoramento genético animal.

A recente revolução que ocorreu nas metodologias e tecnologias de genotipagem e quantificação da expressão gênica em larga escala, com o desenvolvimento de chips e arranjos de DNA (FAN et al., 2006), permite potencializar a estratégia quantitativa clássica no melhoramento com a genética molecular, seja para identificar e estudar genes que afetam características de interesse, seja para viabilizar novas alternativas de avaliação genética e seleção, como no caso da seleção genômica (MEUWISSEN et al., 2001).

A presente proposta visa integrar as competências e estruturas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, através de seus estudantes de pós-graduação, da Embrapa Pecuária Sul (participante da Rede

Genômica Animal), através de seus pesquisadores, conhecimentos e infraestrutura, e da Conexão Delta G, por meio de seus criadores, técnicos e rebanhos. A proposta objetiva viabilizar o avanço do conhecimento nos mecanismos genéticos de resistência a carrapatos em bovinos e o desenvolvimento de métodos e estratégias para combinar ferramentas de genética quantitativa e molecular para seleção genômica dessa característica.

3.2 Objetivos e Metas

Objetivos gerais:

Desenvolver estratégias combinando ferramentas de genética quantitativa e molecular para seleção genômica de animais mais resistentes à infestação natural por carrapatos.

Objetivos específicos:

- Identificar marcadores moleculares de polimorfismos de base única (SNP) em desequilíbrio de ligação com a resistência a carrapatos;
- Buscar mutações causais para os genes de efeito maior na resistência a carrapatos;
- Investigar a função dos genes, suas redes de regulação e processos metabólicos e fisiológicos que estão envolvidos na resistência a carrapatos;
- Preparar resumos e artigos científicos, que serão publicados em congressos nacionais e internacionais e em periódicos da área;
- Elaborar uma tese de doutorado.

3.3 Metodologia e Estratégia de Ação

Os animais que fornecerão dados para as análises deste projeto pertencem a rebanhos das raças Hereford e Braford, criados no Rio Grande do Sul e que participam

do programa de melhoramento Conexão Delta G. A infestação natural por carrapatos destes animais vem sendo acompanhada desde 2001, através da contagem de carrapatos na região do entrepernas (de 2001 a 2008) ou na lateral do corpo (de 2009 a 2010), através da contagem de fêmeas do parasita com tamanho superior a 4,5mm, realizadas nas fazendas participantes por técnicos e produtores. O grau de infestação foi avaliado pela média de pelo menos duas contagens consecutivas, com intervalos de aproximadamente 30 dias, conduzidas no sobreano dos animais. Durante o período de contagens, os animais não receberam antiparasitários com efeito acaricida prolongado.

As informações coletadas em nível de campo foram armazenadas em uma base de dados contendo, além de registros de contagem de carrapatos, dados de desempenho e informações genealógicas. As avaliações foram feitas dentro de grupos contemporâneos, com registros do manejo sanitário e alimentar, de genealogia, e controle de nascimento e produção. O banco de dados gerado foi analisado para obtenção da herdabilidade e da repetibilidade para a contagem, informando se a contagem responderia de forma eficaz à seleção. Estas análises e resultados estão descritos na dissertação “Resistência genética à infestação natural e artificial por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos das raças Hereford e Braford” (BIEGELMEYER, 2012).

Durante a primeira contagem de carrapatos foi coletada uma amostra de sangue de cada animal em cartões de celulose apropriados para armazenamento de DNA em temperatura ambiente. Foram coletadas também amostras de sangue dos principais touros pais usados em monta na propriedade, e doses de sêmen foram obtidas dos touros usados em inseminação artificial. O material foi enviado para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para extração de DNA. Após a extração, 300ng de DNA de cada animal foram enviados para genotipagem em laboratório terceirizado de prestação de serviços no exterior. Dos 2.414 animais com contagem de carrapato já avaliada em 2009/10, 2.160 indivíduos com pelo menos duas contagens de carrapatos e informações de nascimento e pedigree já foram genotipados (chip Bovino da Illumina de 50K marcadores SNP).

Para a caracterização e validação de marcadores SNP em desequilíbrio de ligação, é importante lembrar que existem diversas estatísticas que normalmente são utilizadas na estimação do DL entre dois *loci*. Neste projeto, serão usadas as medidas

D' (LEWONTIN, 1964) e r^2 (HILL; ROBERTSON, 1968). Para quaisquer dois *loci* bialélicos, a estatística D' é definida como:

$$D' = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 p_i q_j \frac{|D_{ij}|}{D_{\max}}$$

onde: $D_{ij} = P_{ij} - p_i q_j$, sendo P_{ij} a frequência do haplótipo ij ($i =$ alelo i no locus 1; $j =$ alelo j no locus 2); e p_i e q_j as frequências do alelo i no locus 1 e do alelo j no locus 2, respectivamente;

$$D_{\max} = \begin{cases} \min[p_i q_j, (1-p_i)(1-q_j)], & \text{se } D_{ij} < 0 \\ \min[p_i(1-q_j), (1-p_i)q_j], & \text{se } D_{ij} > 0 \end{cases}$$

A estatística r^2 é obtida por:

$$r^2 = \frac{D_{ij}^2}{p_1 p_2 q_1 q_2}$$

onde: $D_{ij} =$ como definido acima; p_1, p_2, q_1 e $q_2 =$ frequências dos alelos 1 e 2, nos *loci* p e q , respectivamente.

Os valores de D' e r^2 se situam no intervalo entre 0 e 1 e possuem propriedades desejáveis. O máximo de D' é de fácil interpretação: D' é igual um (chamado de DL completo) se, e somente se, no mínimo um alelo de cada locus está completamente associado com um alelo do outro locus. Entretanto, quando D' é menor do que um, sua interpretação não é clara. A estatística r^2 é a proporção da variação causada pelos alelos do QTL que é explicada pelos marcadores. O declínio nos valores de r^2 com a distância indicam quantos marcadores ou fenótipos são necessários na varredura inicial do genoma para a detecção de QTL. Valores de r^2 iguais a um (chamados de DL perfeito) são obtidos se, e somente se, existem dois haplótipos para os dois *loci* bialélicos, implicando que cada alelo de um locus está completamente associado com um determinado alelo do outro locus e que as frequências alélicas em ambos os *loci* são idênticas. As medidas de r^2 na população será ainda avaliada em relação à distância média entre dois SNPs de cada par.

Na etapa de identificação de genes de efeito maior serão considerados os resultados do estudo de associação entre marcadores SNP e os fenótipos de resistência a carrapatos apresentados pelos animais avaliados. Serão investigadas as mutações causais para os QTL de efeito maior usando as abordagens de mapeamento fino e perfilamento de expressão gênica de candidatos posicionais,

visando complementar as informações a respeito da função dos genes, suas redes de regulação e processos metabólicos e fisiológicos que estão envolvidos na resistência a carrapatos.

3. 4 Resultados e Impactos Esperados

Indicadores de resultados ao final do projeto:

- Identificação de marcadores moleculares SNPs em desequilíbrio de ligação com a característica de resistência a carrapatos;
- Identificação de mutações causais para os genes de efeito maior na resistência a carrapatos;
- Publicação dos resultados;
- Definição das estratégias de uso das informações geradas;
- Defesa da tese.

Repercussão e/ou impactos dos resultados:

O presente projeto propõe-se a desenvolver conhecimentos e ferramentas de seleção genômica para aumentar a resistência dos bovinos ao carrapato. Espera-se, portanto, que o emprego dessa ferramenta no melhoramento dos rebanhos proporcionará, no médio prazo, a criação de linhagens de bovinos que necessitem menos tratamentos, reduzindo, desta forma:

- Os custos dos tratamentos com drogas acaricidas;
- A presença de resíduos químicos na carne e derivados;
- A contaminação do ambiente pelo manejo dos banhos de imersão e pulverização;
- As chances de intoxicação dos trabalhadores que aplicam os tratamentos altamente tóxicos;
- A necessidade de constantemente buscar novos princípios ativos pelo recorrente desenvolvimento de resistência do parasito.

3.6 Aspectos Éticos

As atividades que serão executadas são de risco muito baixo, envolvendo apenas atividades rotineiramente executadas em laboratórios de computação e biologia molecular. Os procedimentos de biologia molecular atenderão às normas de Biossegurança e de Boas Práticas de Laboratório.

As amostras biológicas necessárias para a extração de DNA e genotipagem, e alcance dos objetivos da presente proposta, foram obtidas durante o projeto de pesquisa e dissertação “Resistência genética à infestação natural e artificial por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos das raças Hereford e Braford”, já avaliado e com parecer favorável pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) sob o número de registro 9409. Dentro da presente proposta de projeto, a necessidade de uma coleta de dados biológicos complementar será submetida para avaliação pelo CEEA.

3.7 Orçamento

Os custos abaixo relacionados (Quadro 2), relativos aos principais recursos necessários para as extrações de DNA e genotipagem dos animais, foram cobertos pela Embrapa Pecuária Sul e Rede Genômica Animal.

Quadro 2 - Investimentos parciais referentes aos custos com extração de DNA e genotipagens dos animais envolvidos no projeto.

MATERIAL (Especificação Técnica)	QUANTIDADE	VALOR UNITÁRIO	TOTAL
Kits, reagentes, pipetas, ponteiros e demais materiais necessários para extração de DNA	1	R\$ 10.000,00	R\$ 10.000,00
Genotipagem em BeadChip bovino Illumina 50K	2.160	R\$ 200,00	R\$ 432.000,00
TOTAL			R\$ 442.000,00

3. 8 Referências Bibliográficas

BIEGELMEYER, P. **Resistência genética à infestação natural e artificial por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos das raças Hereford e Braford**. 2012. 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

BIEGELMEYER, P.; CARDOSO, F.F.; GULIAS-GOMES, C.C. et al. Estimation of (co)variance components and genetic parameters for tick resistance in beef cattle measured by two different body regions. In: REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 22., Montevideo, Uruguay, 2011. Proceedings... Montevideo, 2011. p.228.

BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v.129, p.S161-S176, 2004.

CONEXÃO DELTA G. Institucional. 2007. Disponível em <http://www.deltag.com.br/pt_br/pg_institucional.php>. Acesso em 13 de maio de 2012.

CARDOSO, V.; FRIES, L.A.; ROSO, V.M. et al. Estimates of heritability for resistance to *Boophilus microplus* tick evaluated by an alternative method in a commercial Polled Hereford x Nelore population in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., Belo Horizonte, Brasil, 2006. **Proceedings...** Belo Horizonte, 2006. CD-ROM.

DOSSA, S.C.; KAAYA, G.P.; ESSUMAN, S. et al. Acquisition of resistance to the tick *Amblyomma variegatum* in Boran cattle, *Bos indicus* and the effects of *Trypanosoma congolense* and *Babesia bigemina* on host resistance. **Veterinary Parasitology**, v.62, n.3-4, p.317-330, 1996.

FAN, J.B.; CHEE, M.S.; GUNDERSON, K.L. Highly parallel genomic assays. **Nature Reviews Genetics**, v.7, p.632-644, 2006.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.1, p.57-71, 1999.

GOMES, A. **Resistência a infestação natural por larvas, ninfas e adultos de *Boophilus microplus* em vacas zebuínas da raça Gir, em função de sua idade,**

da gestação, da lactação e da seleção para produção leiteira, com e sem tratamento carrapaticida, ao longo de 12 estações consecutivas de um triênio. 1992. 90p. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

MACHADO, M.; AZEVEDO, A.S.; TEODORO, R.L. et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v.11, p.280, 2010.

MEUWISSEN, T.H.E.; GODDARD, M.E. Prediction of identity by descent probabilities from marker-haplotypes. **Genetics Selection Evolution**, v.33, p.605-634, 2001.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação Natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24. n.10, p.1267-1271, 1989.

VERÍSSIMO, C.J.; SILVA, R.G.; OLIVEIRA, A.A.D. et al. Resistência e suscetibilidade de Bovinos Leiteiros Mestiços ao Carrapato *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, v.54. n.2, p.1-10, 1997.

4 Relatório do Trabalho de Campo

4.1 Local

As avaliações fenotípicas para a característica de contagem de carrapatos e as coletas de amostras biológicas para genotipagem dos animais ocorreram em diferentes propriedades localizadas no estado do Rio Grande do Sul. As fazendas que forneceram os dados utilizados no presente estudo foram: Agropecuária Caty S.A. (Santana do Livramento/RS), Estância Guatambu (Dom Pedrito, RS), Estância São Bento (Dom Pedrito, RS), Estância São Manoel (Alegrete, RS), Estância Silêncio (Alegrete, RS), Fazenda Nogueira (Dom Pedrito, RS) e Grupo Pitangueira (Itaqui, RS).

4.2 Período Experimental

As informações de genotipagens utilizadas nas análises foram obtidas a partir de amostras biológicas coletadas de animais nascidos entre os anos de 2008 e 2010. Os dados de contagens de carrapatos se referem a avaliações fenotípicas realizadas entre os anos de 2010 e 2013 nas fazendas participantes.

4.3 Animais Avaliados

Participaram das avaliações bovinos machos e fêmeas das raças Hereford e Braford (com composição genética entre $\frac{1}{2}$ Hereford + $\frac{1}{2}$ Zebu e $\frac{3}{4}$ Hereford + $\frac{1}{4}$

Zebu), provenientes de rebanhos controlados pelo programa de melhoramento da Conexão Delta G (CONEXÃO DELTA G, 2007), uma associação de criadores de Hereford, Braford e Nelore com fazendas em estados das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país.

4. 4 Coleta de Dados

As avaliações fenotípicas consistiram em uma a três contagens manuais de carrapatos, realizadas em um dos lados do corpo dos animais mantidos em tronco de contenção. Para possibilitar tais avaliações, os produtores foram orientados no sentido de suspender a utilização de carrapaticidas de longa ação durante o período de contagens, permitindo assim que os animais se tornassem suscetíveis às infestações.

A extração de DNA para genotipagem foi realizada a partir de amostras de sangue armazenadas em cartões FTA ou amostras de sêmen criopreservado. A genotipagem e o processo de controle de qualidade dos genótipos gerados foram conduzidos através do software GenomeStudio (Illumina Inc. San Diego, CA), de acordo com as recomendações do fabricante.

4. 5 Análises Estatísticas

Os níveis de desequilíbrio de ligação foram determinados através da estatística r^2 descrita por Hill e Robertson (1968), e a persistência de fase entre as populações foi calculada conforme proposto por Badke et al. (2012). O tamanho efetivo de população foi determinado com base no declínio dos valores de desequilíbrio de ligação, de acordo com o aumento da distância entre marcadores. Para avaliar a heterogeneidade intra e intercromossomal, utilizaram-se ainda dois modelos de análise de covariância. Todas as análises foram realizadas através de scripts desenvolvidos no programa R (R CORE TEAM, 2013).

Para o estudo de associação entre marcadores e a característica de resistência ao carrapato objetivado no segundo trabalho, foi utilizada a metodologia de passo único (*single-step* - ssGBLUP), proposto por Wang et al. (2012). Esta abordagem combina toda a informação genômica, fenotípica e de pedigree em um único passo para a predição dos valores genéticos genômicos, dos quais são derivados os efeitos dos marcadores. As análises desta etapa foram realizadas através de programas da família BLUPF90 (MISZTAL et al. 2012).

4. 6 Resultados

Os resultados obtidos serão encaminhados para publicação em periódicos científicos na área de Zootecnia e Medicina Veterinária.

5 Artigo 1

Linkage disequilibrium, persistence of phase and effective population size estimates in Hereford and Braford cattle*

Patrícia Biegelmeyer¹, Claudia C. G. Gomes², Alexandre R. Caetano^{3,4,5}, Juan P. Steibel⁶, Fernando Flores Cardoso^{1,2,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil

²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁵Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil

⁶Michigan State University, Michigan, Unites States

Email addresses:

PB: patriciabiegel@gmail.com

CCGG: claudia.gulias@embrapa.br

ARC: alexandre.caetano@embrapa.br

JPS: steibelj@msu.edu

FFC: fernando.cardoso@embrapa.br

Abstract

Background: The existence of moderate to high levels of linkage disequilibrium (LD) between genetic markers and quantitative trait loci (QTL) affecting traits of interest is fundamental for the success of genome-wide association and genomic selection (GS) studies. Knowledge about the extent and the pattern of LD in livestock populations is essential to determine the density of single-nucleotide polymorphisms (SNP) required for accurate QTL mapping and GS. Moreover, observed LD is related to historical effective population sizes (N_e), and can provide insights into the genetic diversity history of populations. Estimates of the consistency of linkage phase across breeds can be used to determine if there is sufficient relationship to use pooled reference populations in multi-breed GS programs. The objective of this study was to estimate LD levels, persistence of phase and effective population size in Hereford and Braford cattle populations sampled in Brazil.

Results: Mean LD estimates, measured using the squared correlation of alleles at two loci (r^2), obtained between adjacent SNP across all chromosomes were 0.21 ± 0.27 for Herefords (391 samples with 41,241 SNP) and 0.16 ± 0.22 for Brafords (2,044 samples and 41,207 SNP). Estimated r^2 was > 0.2 and 0.3 , respectively, for 34% and 25% of adjacent markers in Hereford, and 26% and 17% in Brafords. Current estimated N_e for Brafords and Herefords were 220 and 153 individuals, respectively. The two breeds demonstrated moderate to strong persistence of phase at all distances (range = 0.53 to 0.97). The greatest phase correlations ($r > 0.9$) were found in the 0 to 50Kb bins (range = 0.92 to 0.97). Estimated LD decreased rapidly with increasing distance between SNP, however, useful linkage for QTL mapping and GS ($r^2 > 0.2$) was found spanning to ~50Kb.

Conclusions: SNP panels containing about 50,000 and 150,000 markers are necessary to design effective genome-wide association and GS studies to Hereford and Braford breeds, respectively. Markers are expected to be in phase with QTL alleles in distances < 50 Kb in both populations due to observed high levels persistence of phase.

Background

The evolution of molecular biology techniques observed over the last decades provided great progresses to studies focused on unveiling underlying genetic factors and improving rates of genetic gains for economically important traits in livestock. The availability of high-density single nucleotide polymorphisms (SNP) genotyping assays for cattle and advances in computational and statistical methods allowed the generation and use of large amounts of genomic data in genome-wide association (GWAS) and genomic selection (GS) studies for production relevant traits [1]. These advancements created new opportunities to identify and select animals with superior genetic merit, while reducing generation intervals and overall associated costs [2,3].

Existence of linkage disequilibrium (LD) between causative variants and genetic markers is fundamental for achieving success in GWAS and GS studies since both rely on the non-random associations between markers and functional mutations affecting traits of interest [4,5]. Existing LD levels are usually affected by genetic (selection, mutation, drift, migration, and non-random mating) and non-genetic (marker ascertainment bias) factors [6-8] and can reflect historical effective population sizes and rates of recombination in a population [9].

Studies to understand LD levels and structure in livestock species are necessary for revealing diversity levels among breeds and detecting regions of genome that have been historically subjected to different selection pressures [10,11]. Knowledge about historical effective population sizes is also important to determine optimal selection pressures [12] for achieving breeding goals while maintaining acceptable levels of genetic diversity in breeding populations [13]. Estimates of linkage phase consistency across breeds and populations are also essential for determining the potential success of using data from pooled reference populations for multi-breed genomic evaluation and selection programs [14].

The use of low-density SNP panels to reduce genotyping costs, while maintaining prediction accuracies, can be achieved by inferring missing genotypes with basis on reference haplotype catalogues generated with higher density datasets. Genotype imputation is an important step for performing GS at a lower cost [15]. Genomic breeding values predicted from imputed genotypes have shown similar levels of accuracy to those derived from high-density genotypes [16-18].

The objective of this study was to estimate linkage disequilibrium levels at varying SNP densities, persistence of phase and effective population sizes in Brazilian Hereford and Braford cattle populations.

Methods

Sample collection and genotyping

Samples from a total of 391 Hereford and 2,079 Braford (with a breed composition ranging between $\frac{1}{2}$ Hereford + $\frac{1}{2}$ Zebu and $\frac{3}{4}$ Hereford + $\frac{1}{4}$ Zebu) cattle born between 2008 and 2010 in commercial farms associated with the Delta G Connection Genetic Improvement Consortium [19] were used in this study. Braford cattle ranged breed composition between 50% Hereford + 50% Zebu and 75% Hereford + 25% Zebu. DNA was extracted from blood samples from FTA cards or from cryopreserved semen. Genotyping of all samples was performed with Illumina BovineSNP50v2 (50K) BeadChip (Illumina Inc., San Diego, USA). In addition, data from 40 bulls (17 Hereford and 23 Braford) genotyped with Illumina High-Density (HD) Bovine BeadChip Array (Illumina Inc., San Diego, USA) were also included in the final dataset. Genotype calling and initial data quality control (QC) were performed using GenomeStudio software (Illumina Inc. San Diego, CA), according to manufacturer's protocols. Genotypes with a GenCall Score < 0.15 were set as missing genotypes.

Data quality control

Additional QC was performed with R snpStats package [20]. Samples with call rates < 0.90 , heterozygosity deviations > 3.0 standard deviations, conflicts between declared and genotype-based sex, and duplicated genotypes with different sample identification were removed from the final dataset. Only SNP located on autosomes (BTA) were considered in further analyses. SNP with call rates < 0.98 , minor allele frequencies (MAF) < 0.03 and highly significant deviations ($P < 10^{-6}$) from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were also excluded. Moreover, whenever multiple SNP were observed in the same physical map position, only one SNP with highest MAF was retained. The high-density (HD) panel was filtered to select only the SNP also present in the 50K panel.

Haplotype reconstruction and phasing

Haplotype reconstruction and imputation of sporadically missing genotypes (0.39%) were carried out using FImpute 2.0 [21]. Expectation-Maximization algorithm employed initially estimates the most probable haplotypes considering observed genotypes, using pedigree relationship information. Subsequently, the program performs genotype imputation using a haplotype search based on a sliding window approach, walking along each chromosome and using overlapping windows to reconstruct haplotypes [22].

Linkage disequilibrium analysis

Linkage disequilibrium was calculated as pairwise r^2 [23], which relies on the allele phase information at the gametic level. Considering two marker loci (A and B), each one with two alleles (A1, A2, B1 and B2), the frequency of alleles in the population can be denoted p_{A1} , p_{A2} , p_{B1} and p_{B2} , and the frequency of haplotypes with allele 1 at marker locus A and allele 1 at locus B, for example, denoted p_{A1B1} . Following Hill and Roberson [23],

$$r^2 = \frac{(p_{A1B1}p_{A2B2} - p_{A1B2}p_{A2B1})^2}{p_{A1}p_{A2}p_{B1}p_{B2}}. \quad (1)$$

For each population, LD values between all pairs of SNP of all chromosomes were binned according to physical distance separating the loci. Average values of r^2 were calculated for each bin.

To evaluate the feasibility of successfully using sparse marker panels in GWAS and GS studies, average r^2 between adjacent markers was calculated for different marker densities, sequentially removing SNP from the total dataset using every second, fourth, fifth, sixth, seventh and 14th marker (using, respectively, 50%, 25%, 20%, 17%, 14% and 7% of available SNP). LD estimates were calculated according to Badke et al. [24], using `ld_estimate` R scripts [20].

Intra and inter chromosomal and breed heterogeneities

To investigate intra and inter chromosomal and breed variation in LD, analysis of covariance with general linear models were fitted. First, the following linear model was used to estimate the effects of genetic distance (covariate), chromosome, breed

and the chromosome x breed interaction on LD through a total of 82,356 adjacent breed-specific marker pairs:

$$r_{ijk}^2 = \mu + c_i + b_j + \beta_1(d_k^*) + cb_{ij} + e_{ijk}. \quad (2)$$

Then, a more complex linear model was used to estimate the adjusted mean r^2 at certain distances, using all of the 12,911,174 SNP pairs. The distances considered refer to the different densities of some commercially available panels: 150K (GeneSeek Genomic Profiler HD-150K), 80K (GeneSeek Genomic Profiler HD-80K), 50K (Illumina BovineSNP50v2 BeadChip), 20K (GeneSeek Genomic Profiler LD v2), 8K (Illumina BovineLD v.2 BeadChip) and 3K (Illumina Bovine3k BeadChip). The most complete model used was:

$$\begin{aligned} r_{ijk}^2 = & \mu + c_i + b_j + \beta_1(d_k^*) + cb_{ij} + c\beta_{1i}(d_k^*) + b\beta_{1j}(d_k^*) + cb\beta_{1ij}(d_k^*) + \\ & \beta_2(d_k^*)^2 + c\beta_{2i}(d_k^*)^2 + b\beta_{2j}(d_k^*)^2 + cb\beta_{2ij}(d_k^*)^2 + \\ & \beta_3(d_k^*)^3 + c\beta_{3i}(d_k^*)^3 + b\beta_{3j}(d_k^*)^3 + cb\beta_{3ij}(d_k^*)^3 + e_{ijk}. \end{aligned} \quad (3)$$

For Equations 2 and 3, r_{ijk}^2 was the observed LD over marker distance d_k on chromosome i of breed j , μ is the overall mean of r_{ijk}^2 across markers pairs, c_i is the effect of chromosome i , b_j is the effect of breed j , β_1 , β_2 and β_3 are the regression coefficients (linear, quadratic and cubic, respectively) on marker distance, d_k^* is the adjusted marker distance ($\log_{10} d_k - \log_{10} \bar{d}$), d_k is the observed physical distance for the marker pair k , \bar{d} is the average physical distance between markers, and e_{ijk} is the residual effect. Genetic distances were \log_{10} transformed in an attempt to linearize the relationship between LD and the log-transformed distance [30], but higher order coefficients (β_2 and β_3) were fitted to consider possible deviations of this expected linearity and interaction with breed and chromosome effects ($c\beta_{ij}$, $b\beta_{ij}$ and $cb\beta_{ij}$ terms). All analysis was performed using R package [20].

Persistence of phase analysis

The degree of phase concordance between the two breeds for pairs of SNP was calculated according to Badke et al. [24] with the following formula:

$$R_{k,k'} = \frac{\sum_{(i,j) \in p} (r_{ij(k)} - \bar{r}_{(k)})(r_{ij(k')} - \bar{r}_{(k')})}{S_{(k)}S_{(k')}} , \quad (4)$$

where $R_{k,k'}$ is the correlation of phase between $r_{ij(k)}$ in population k and $r_{ij(k')}$ in population k' , $S_{(k)}$ and $S_{(k')}$ are the standard deviations of $r_{ij(k)}$ and $r_{ij(k')}$, respectively, $\bar{r}_{(k)}$ and $\bar{r}_{(k')}$ are the average r_{ij} across all SNP i and j within interval p for populations k and k' , respectively. Positive r values are expected when two markers show positive r^2 values and equal phase in both studied populations [25]. SNP pairs were binned according to marker distances, and average values of r were calculated for each bin, using markers common to both breeds.

Estimation of effective population size

Estimates of LD decay in relation to different SNP distances were used to infer effective population sizes (N_e) of the two studied cattle breeds. The relationship between r^2 and N_e can be expressed by the formula:

$$r^2 = \frac{1}{(4cN_e + 1)} , \quad (5)$$

where c is the genetic distance between two markers expressed in Morgans [26]. Effective population size was estimated considering each SNP pair located within 100 Mb of the same chromosome, with physical distances between SNP converted to genetic distances, assuming 1 Mb = 1 cM [27,28]. Because generations are discrete and distances between SNP are continuous, historical effective population size (N_{et}) for a given generation $t = 1/2c$ in the past was assessed by selecting SNP pairs with map distance within corresponding ranges of c values. When applied in $t = 1/2c$, the resulting t value was rounded to the target generation. For example, r^2 of all SNP pairs with distance between 33.3 cM ($t = 1.5$) and 1 M ($t = 0.5$) of the same autosomal chromosome were selected to calculate N_e at $t = 1$. Then, within each bin, the average values of r^2 and c were obtained and applied in the formula:

$$N_{et} = \frac{(1-r^2)}{4cr^2}, \quad (6)$$

for $0.0 < r^2 < 1.0$. Longer c ranges were used to define generation bins as we moved further in the past, because they correspond to shorter distances with fewer markers and we wanted to ensure sufficient numbers of SNP pairs for reliably estimating N_{et} within each bin [29]. The actual bins were of one generation for t between 1 and 10, e.g. a range from 0.5 to 1.5 for the current general; five generations for t between 15 and 100, and of 50 generations for t between 150 and 1000.

Results

SNP quality control

Data QC excluded 43 samples with call rates < 0.03 , 24 samples with heterozygosity deviations > 3.0 standard deviations, eight samples with incorrect sex assignment and eight duplicated genotypes with different sample identification. The final resulting dataset contained 2,435 samples (391 Hereford and 2,044 Braford). Some samples were excluded for not meeting more than one criteria of QC. The data QC also removed 4,232 SNP with call rates < 0.98 , 5,712 SNP with MAF < 0.03 , and 1,342 SNP with highly significant HWE deviations ($P < 10^{-6}$). Estimated means for call rate, MAF and HWE were 0.998, 0.271, and 0.541, respectively. The final resulting dataset contained a total of 41,241 autosomal SNP (75.52%) in Braforfs and 41,207 autosomal SNP (75.46%) in Hereforfs.

Linkage disequilibrium

Average $r^2 \pm$ SD between adjacent SNP across all chromosomes was 0.21 ± 0.27 for Hereford and 0.16 ± 0.22 for Braford. The analysis revealed a rapid decrease in LD in both populations with increasing physical distances (Figure 1). Hereforfs showed higher LD than Braforfs up to a distance of 1.78Kb. For larger distances, Braforfs showed a mean of r^2 slightly higher than Hereforfs.

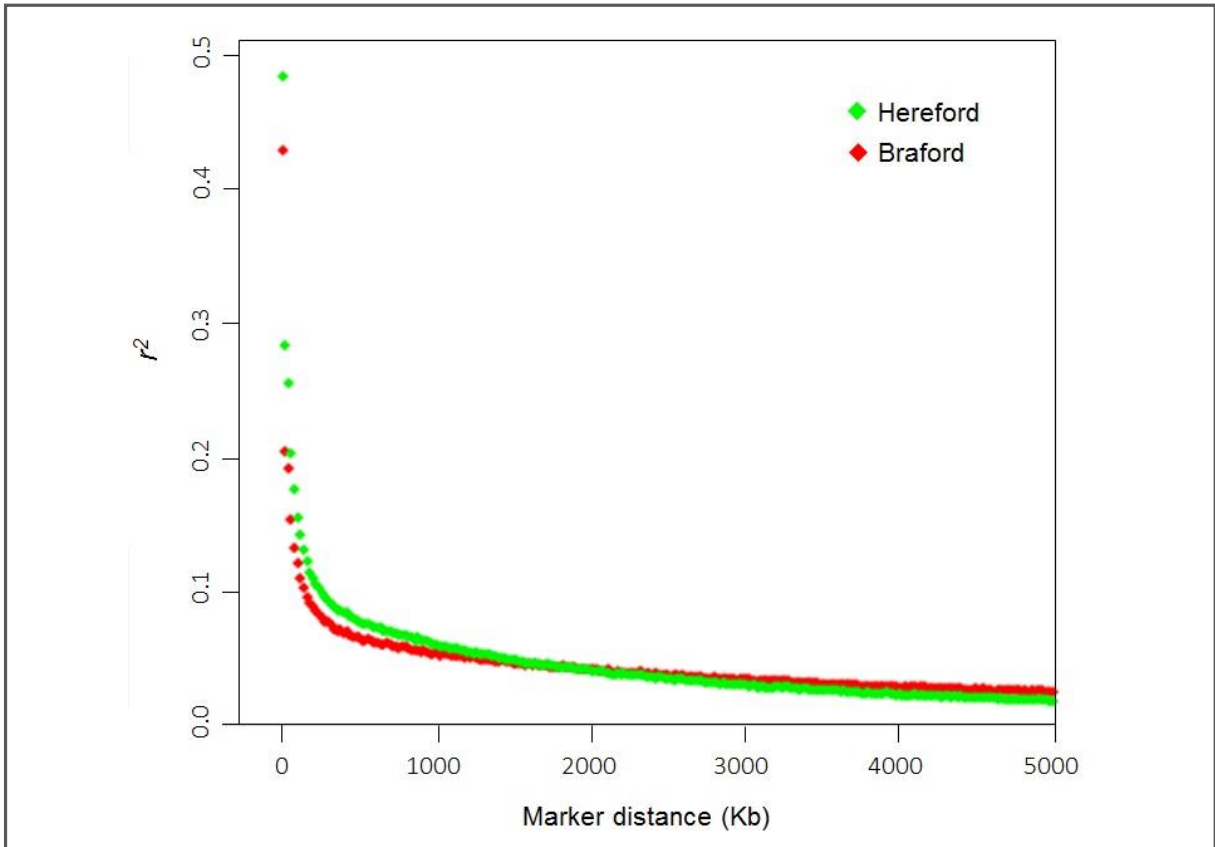


Figure 1 - Extent of linkage disequilibrium (r^2) as a function of inter-marker distance in Hereford and Braford populations

Average LD for markers at eight distance intervals are presented in Table 1. At distances of 50Kb, average LD was 0.25 ± 0.29 for Herefords and 0.18 ± 0.24 for Brafords. In Brafords, average r^2 decayed faster than in Herefords with the increase of distance, declining to 50% of its initial value at ~5Kb whereas in Herefords the same decline was observed at ~50Kb. Observed LD was > 0.2 and 0.3 , respectively, for 34% (14,010 SNP) and 25% (10,302 SNP) of adjacent markers in Herefords, and 26% (10,722 SNP) and 17% (7,011 SNP) in Brafords.

Table 1 - Average $r^2 \pm$ SD between adjacent markers according to inter-marker distances in Hereford and Braford populations

Inter-marker distance	Hereford	Braford
1Kb	0.49 ± 0.45	0.43 ± 0.39
5Kb	0.28 ± 0.35	0.20 ± 0.30
50Kb	0.25 ± 0.29	0.18 ± 0.24
0.1 Mb	0.17 ± 0.23	0.13 ± 0.18
0.5 Mb	0.10 ± 0.15	0.08 ± 0.12
1 Mb	0.07 ± 0.11	0.06 ± 0.09
5 Mb	0.03 ± 0.05	0.03 ± 0.05
10 Mb	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.03

Estimated r^2 values > 0.2 were observed in the 0 to 60Kb bins in Herefords (range = 0.20 to 0.49), and in the 0 to 20Kb bins in Brafords (range = 0.21 to 0.43). Average r^2 values > 0.3 were observed in the 0 to 1Kb bins in Herefords (0.49) and Brafords (0.43). LD estimates obtained from sparse maps of markers were low (Table 2).

Table 2 - Average $r^2 \pm$ SD for adjacent SNP according to marker panel density in Hereford and Braford populations

% SNP kept ¹	Hereford		Braford	
	Average r^2	Average distance (Kb)	Average r^2	Average distance (Kb)
50%	0.15 \pm 0.21	121.80	0.12 \pm 0.17	121.83
25%	0.11 \pm 0.16	243.57	0.09 \pm 0.13	243.00
20%	0.09 \pm 0.14	304.22	0.08 \pm 0.11	303.78
17%	0.09 \pm 0.14	364.97	0.07 \pm 0.11	364.47
14%	0.08 \pm 0.13	425.83	0.07 \pm 0.10	425.30
7%	0.07 \pm 0.10	850.22	0.06 \pm 0.09	849.50

¹In relation to the total number of SNP obtained for each population after the quality control (41,207 SNP in Hereford and 41,241 SNP in Braford).

Considering only 50% of available SNP (a panel with about 20K SNP), observed average r^2 decreased from 0.21 to 0.15 in Herefords, and from 0.16 to 0.12 in Brafords. When 20% of SNP were maintained in the map (using only every fifth SNP and a density similar to the 8K panel), average r^2 decreased to 0.09 in Herefords and to 0.08 in Brafords. Similarly, as observed in LD values, the percentage of pairs of markers with r^2 values > 0.2 and with average $r^2 > 0.3$ decreased when sparse maps were analyzed (Table 3). Using only every fifth marker (20% of available SNP), the percentage of markers with $r^2 > 0.2$ decreased from 34% to 15% in Herefords and from 26% to 10.1% in Brafords, while the percentage of markers with $r^2 > 0.3$ decreased from 25% to 8.3% in Herefords, and from 17% to 4.9% in Brafords.

Table 3 - Percentage of adjacent SNP with average $r^2 > 0.2$ and > 0.3 according to marker panel density in Hereford and Braford populations

% SNP kept ¹	Hereford		Braford	
	% $r^2 > 0.2$	% $r^2 > 0.3$	% $r^2 > 0.2$	% $r^2 > 0.3$
50%	24.49	16.41	18.33	11.09
25%	17.35	10.59	12.52	6.69
20%	15.02	8.33	10.12	4.96
17%	14.80	8.03	9.98	4.58
14%	13.18	6.59	8.95	4.03
7%	8.37	3.83	6.76	2.70

¹In relation to the total number of SNP obtained for each population after the quality control (41,207 SNP in Hereford and 41,241 SNP in Braford).

Intra and inter chromosomal and breed heterogeneities

Average distances between SNP in different chromosomes were similar, and average physical distances between adjacent markers on Hereford and Braford autosomes was 61Kb. For all chromosomes, average r^2 between adjacent SNP was larger in Herefords than Brafords (Table 4). Estimated r^2 values ranged from 0.16 (BTA23) to 0.26 (BTA6) in Herefords, and from 0.13 (BTA23, BTA28 and BTA29) to 0.20 (BTA6) in Brafords.

Table 4 - Number of SNP, average $r^2 \pm$ SD and mean of length distances between adjacent markers in autosomes of Hereford and Braford populations

Chr	Length (Mb)	Hereford		Braford	
		n SNP	Average r^2	n SNP	Average r^2
1	161.02	2697	0.24 ± 0.29	2699	0.17 ± 0.23
2	137.63	2197	0.23 ± 0.29	2200	0.18 ± 0.23
3	125.67	2000	0.21 ± 0.27	2001	0.17 ± 0.22
4	120.64	1987	0.23 ± 0.28	1988	0.16 ± 0.21
5	124.68	1732	0.20 ± 0.26	1734	0.16 ± 0.22
6	119.22	2066	0.26 ± 0.30	2069	0.20 ± 0.24
7	112.63	1824	0.25 ± 0.29	1824	0.19 ± 0.24
8	116.03	1958	0.23 ± 0.29	1959	0.18 ± 0.23
9	105.59	1670	0.23 ± 0.29	1671	0.17 ± 0.23
10	104.22	1760	0.21 ± 0.27	1761	0.16 ± 0.22
11	107.25	1805	0.20 ± 0.26	1806	0.16 ± 0.22
12	91.06	1342	0.21 ± 0.27	1344	0.15 ± 0.20
13	84.18	1449	0.19 ± 0.26	1449	0.15 ± 0.20
14	84.59	1471	0.23 ± 0.28	1471	0.18 ± 0.23
15	85.26	1374	0.19 ± 0.25	1374	0.15 ± 0.20
16	81.32	1314	0.21 ± 0.27	1314	0.16 ± 0.22
17	75.00	1249	0.20 ± 0.27	1250	0.15 ± 0.21
18	65.98	1036	0.21 ± 0.27	1038	0.16 ± 0.21
19	64.01	1058	0.17 ± 0.23	1059	0.14 ± 0.20
20	72.20	1264	0.19 ± 0.25	1264	0.15 ± 0.21
21	71.08	1124	0.20 ± 0.26	1124	0.16 ± 0.22
22	61.38	1021	0.20 ± 0.27	1025	0.15 ± 0.21
23	52.29	838	0.16 ± 0.23	838	0.13 ± 0.19
24	63.40	1014	0.21 ± 0.27	1018	0.16 ± 0.21
25	42.77	753	0.19 ± 0.25	755	0.15 ± 0.21
26	51.64	867	0.20 ± 0.27	867	0.14 ± 0.21
27	45.37	763	0.17 ± 0.24	764	0.14 ± 0.20
28	46.22	747	0.19 ± 0.24	747	0.13 ± 0.18
29	51.48	827	0.18 ± 0.25	828	0.13 ± 0.19

Chr = autosomes

Covariance estimates between adjacent SNP (Equation 2) revealed that genetic distance, breed and chromosome have significant effects on r^2 ($P < 0.001$), whereas the interaction between breed and chromosome was not significant. Least square means \pm SE of r^2 adjusted across breeds are shown in Figure 2 for each chromosome.

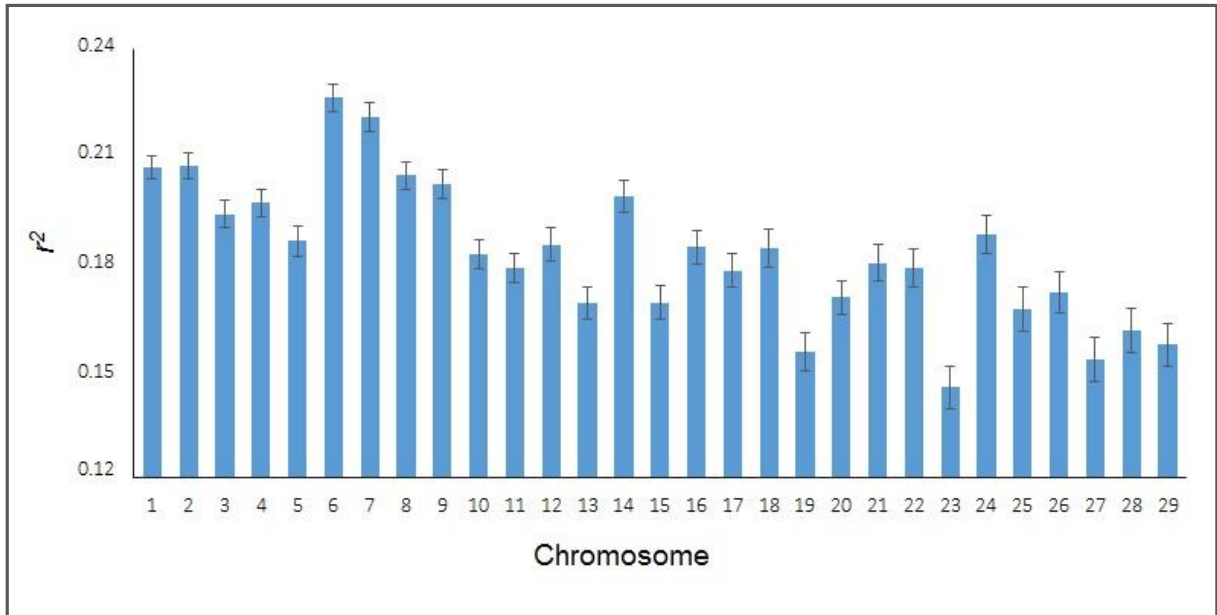


Figure 2 - Extent of linkage disequilibrium (r^2) \pm standard errors for adjacent markers by chromosomes in Hereford and Braford populations

Covariance estimates considering all SNP pairs (Equation 3) revealed significant effects of linear, quadratic and cubic genetic distance coefficients, breed, chromosome, and all interactions ($P < 0.001$). Adjusted r^2 means at specific distances for Herefords and Brafords are shown in Figure 3 for chromosomes with the greatest, lowest and intermediate LD averages (BTA6, BTA23 and BTA10, respectively).

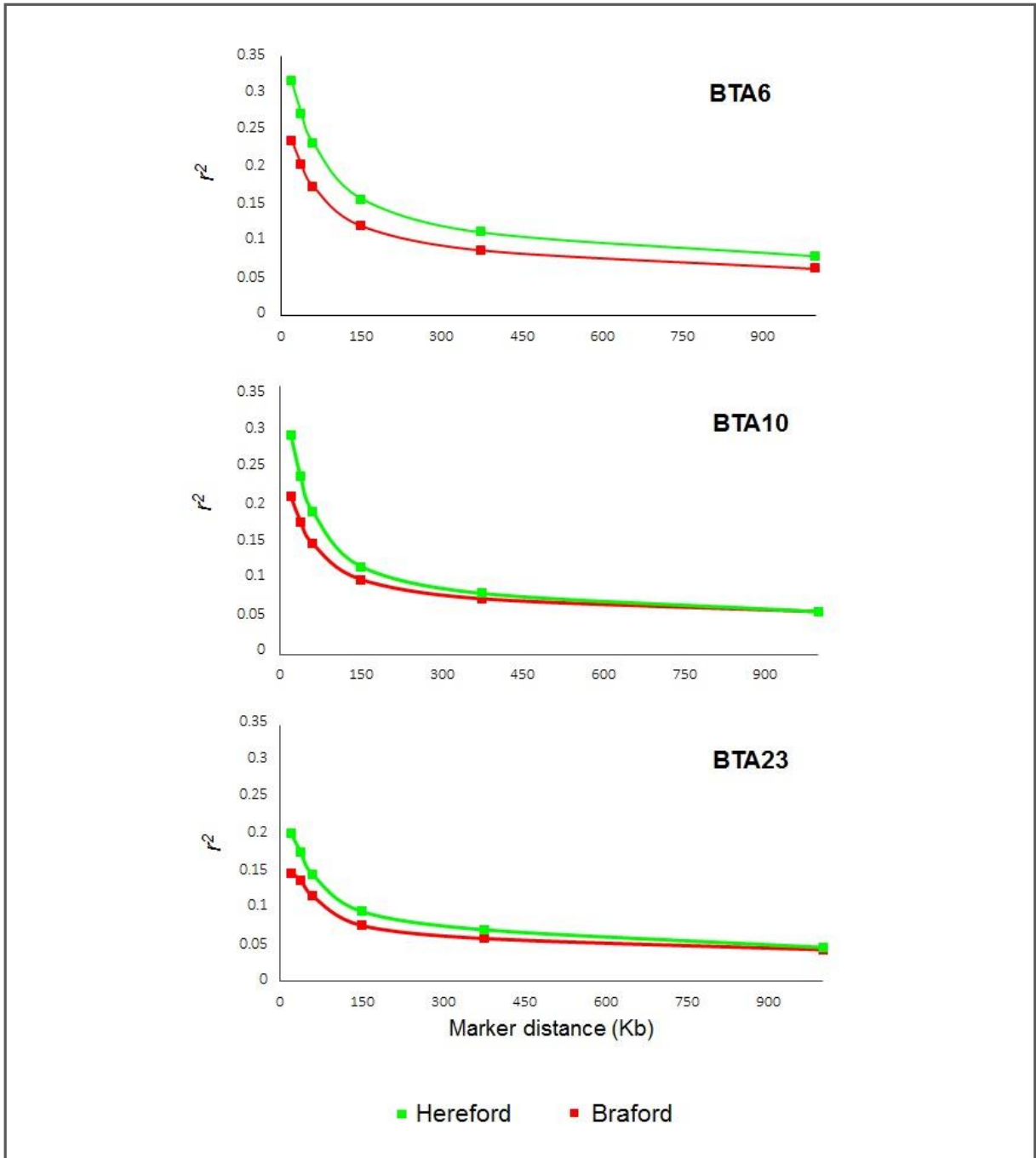


Figure 3 - Linkage disequilibrium (r^2) as a function of inter-marker distance (considering chips of 150K (20Kb); 80K (38Kb); 50K (60Kb); 20K (150Kb); 8K (375Kb); and 3K (1000Kb) in chromosomes 6, 10 and 23 in Hereford and Braford populations

Effective population size

Although current estimated effective population size (Figure 4) for Braford's ($N_e = 220$) is larger than for Hereford's ($N_e = 153$), different recent N_e trends were observed for the two studied populations. Braford's decreasing historical N_e trend was reversed

and sharply increased in the last two generations, while Herefords had an accelerated N_e decline starting four generations ago. Consequently, the relative positions of the breed were changed, reestablishing the larger past effective size of Braford compared to Hereford, which was observed up to about thirty generations ago, when respective values were 315 and 309 for the two populations.

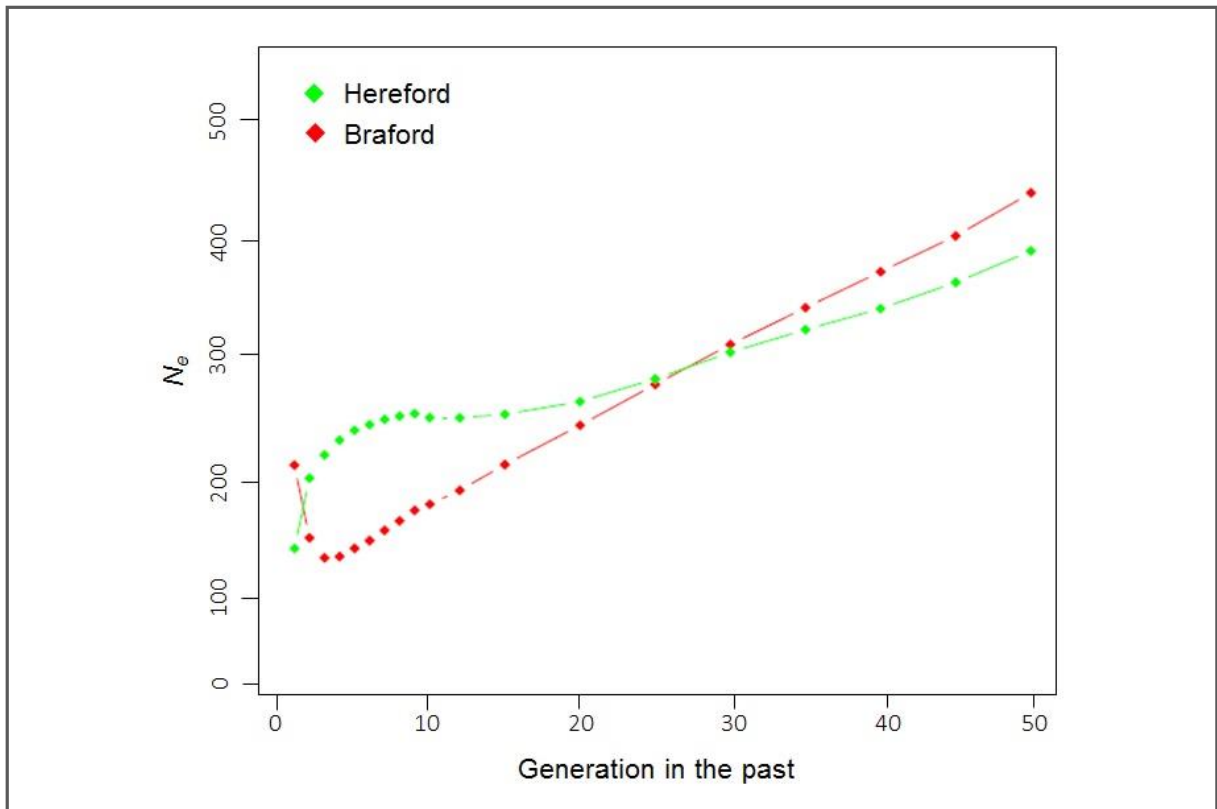


Figure 4 - Estimated effective population size (N_e) as a function of generation in the past in Hereford and Braford populations

Persistence of phase

Moderate to strong persistence of phase at all distances (range = 0.53 to 0.97) were observed for both breeds (Figure 5). Phase correlations decreased rapidly with increasing distances between SNP, as was similarly observed for average r^2 . For markers < 50Kb apart mean estimated r was 0.92, decreasing to 0.74 and 0.53 at marker distances of 1 and 5 Mb, respectively. Marker phase correlation values of $r > 0.9$ were found in the 0 to 50Kb bins (range = 0.92 to 0.97), and the proportion of SNP with reversed r signs was lower, ranging from 5% at 1Kb to 34% at 10 Mb distance.

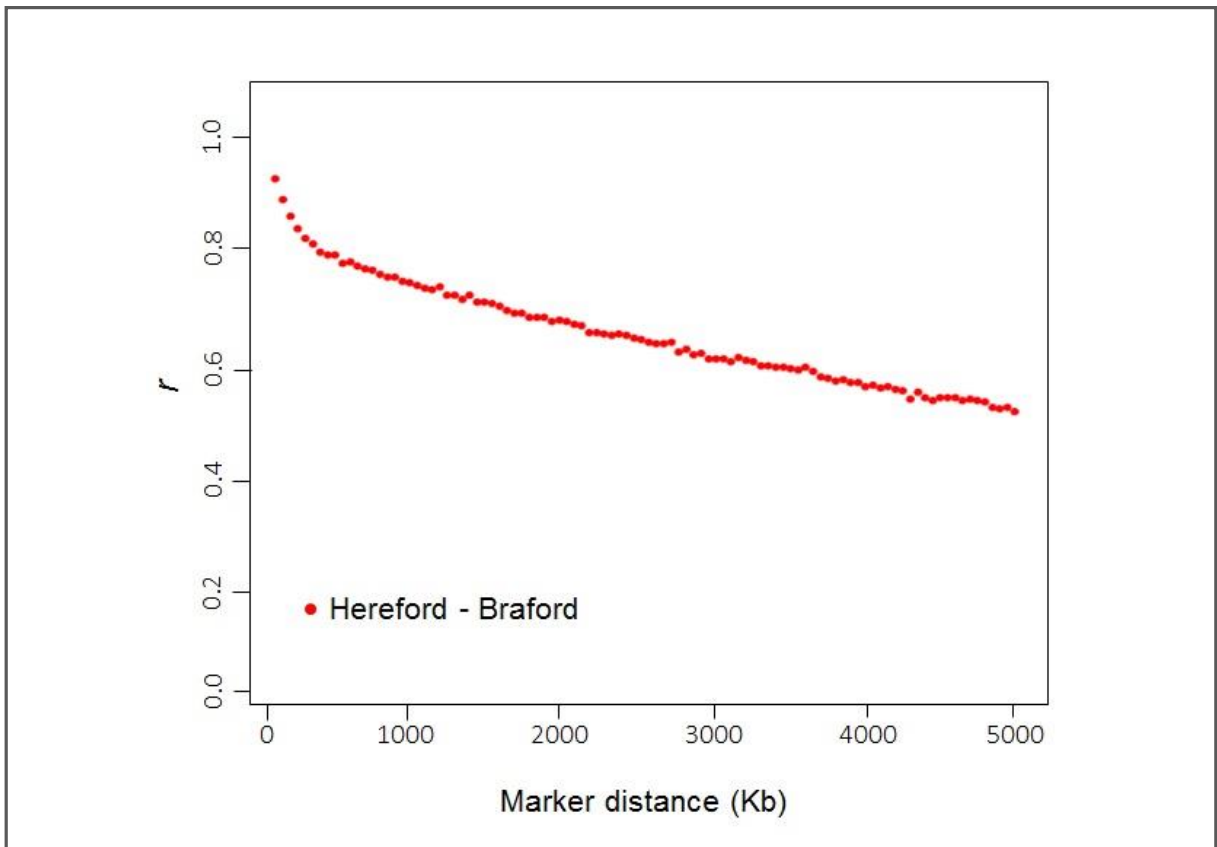


Figure 5 - Correlation of phase (r) between Hereford and Braford populations for SNP pairs at varying marker distances

Discussion

Numerous research studies have been conducted to estimate the pattern and extent of LD in different domestic animal species [10,24,30,31]. Obtained results are essential for fine-tuning experimental designs to increase GWAS and GS efficiency and accuracies in studied populations, and can therefore have great impact in realized rates of genetic progress in economically important traits. Linkage disequilibrium patterns and scale within and between populations/breeds can be influenced by several factors such as marker allele frequencies, selection history, population structure and effective size, marker type and density, as well as which LD measure is used [11,27,32,33]. Therefore, these factors should be considered when conclusions are drawn from comparisons between different studies. The choice of r^2 [23] to estimate LD in Hereford and Braford data was based on the parameter's lower

sensitivity to variations in allele frequency [33] and sample size [34,35], when compared to D and D' .

Robust ascertainment bias towards informativeness in taurine breeds has been observed in the 50K panel [36] and has to be considered when interpreting population genetics inferences based on LD estimates. Using a high density marker panel (446,985 SNP) and 795 genotyped Nelore steers, Espigolan et al. [37] observed an overall average r^2 of 0.17. Lower mean LD estimates were also reported for *Bos indicus* breeds by Villa-Angulo et al. [38] when analyzing a dataset with 31,857 SNP derived from the 50K panel from 487 animals of seventeen taurine and indicine breeds. Reports of estimated larger historical effective population sizes for *B. indicus* breeds may be representative of differences which occurred during the domestication and selection processes of *B. indicus* and *B. taurus* cattle, and offers a plausible explanation for the lower LD levels observed in indicine populations [10,39]. Considering an expected average of 3/8 Zebu contribution to Braford breed composition, the lower average r^2 observed in this population can be a result of those differences reported for *B. indicus* and *B. taurus* breeds in terms of past effective population sizes and selection processes during breed formation.

Both studied populations presented an inverse relationship between LD and inter-marker distances, and this decline of LD as a function of distance agrees with other studies based on r^2 estimates in cattle [10,33,37,40]. The Bovine Hap-Map Consortium [41] reported that, in general, *B. indicus* breeds had lower r^2 values at short distances and higher r^2 values at longer distances between markers when compared to *B. taurus* breeds. As the extent of LD at short inter-marker distances reflect the historic effective population size [39], rapid decline in average r^2 of Braford compared to the decrease of r^2 in Hereford can be associated to differences in effective population size of the breeds.

As demonstrated in Figure 4, the effective population size for both breeds has declined over time as reflection of the historical process of domestication and breed formation [41]. The Braford N_e trend in the last two generations (Figure 4) could result of a recent breeders' effort to increase diversity of this population through the introduction of foreigner lineages formed with Brahman zebu contribution after a local development essential based on the limited pool of Nelore breed sires, while, on the other hand, a more restricted use of sires has been observed in latest Hereford

generations (Lopa TBP, personal communication). Decreases in effective population sizes has been widely observed within the last ~50 years in different cattle breeds, mostly due to the advent of artificial insemination which allowed the intense use of fewer animals and high selection pressures for specific traits [42].

Selection can lead to increased interchromosomal LD heterogeneity [43]. Thus, higher LD values observed in BTA6 in Braford and Hereford in comparison to other chromosomes can be indicative of the presence of QTL affecting traits that have been under intense selection in both breeds. The absence of a breed \times chromosome interaction effects indicate that even though high levels of interchromosomal LD heterogeneity were observed, similar trends were observed in Braford and Hereford, which is in agreement with the historical selection objectives applied to both breeds. Moreover, Hereford are expected to have contributed 5/8 of the Braford genome and both populations analysed in this study have been under selection for the same traits using a common selection index [19].

Information about chromosome-specific variation in LD levels could be used to determine optimal marker density required in each chromosome and breed for generating enough genotypes for performing GWAS and GS studies [34,43]. This information could be used to design customized marker panels for Hereford and Braford cattle with different chromosome-specific densities or to choose commercially available panels that would yield the desired LD levels across the whole genome. For example, if one considers $r^2 = 0.2$ as the target minimal LD between adjacent markers and chooses the 80K panel for genotyping, BTA6 and BTA10 in Hereford and only BTA6 in Braford would be above the LD threshold (Figure 3). To reach average $r^2 > 0.2$ in all chromosomes genotyping with 150K is required in Hereford and HD in Braford. Alternatively, animals genotyped with panels below the desirable density could be imputed to higher densities, provided that reference haplotype panels are available for the respective populations [44].

The across-population, or across-breed, accuracy of GS estimates based on prediction equations derived from a specific reference population depends basically on the LD phase persistence across studied populations, which in turn reflects their genetic relationship [45]. Even when high r values are observed across populations, if a large proportion of SNP are in reversed phase, the result of selection for these markers will lead to antagonistic responses [14]. Our estimates of phase correlation

indicated that markers in LD at distances lower than 50Kb in Herefords show similar levels of LD in Braford, and a high proportion of these SNP share the same linkage phase. This high observed r values were expected, since Braford are composites with a contribution of 62.5% of the Hereford breed. The correlation of r values between populations for the same marker pairs proportionally decreases with the extent of divergence between the populations. To find markers that are in LD with QTL across diverged breeds, such as Australian Angus and New Zealand Jersey populations, de Roos et al. [14] concluded that a ~300,000 marker panels would be required. In our case, due to the genetic similarity of Hereford and Braford breeds, 50K panel data can be pooled into a single reference population for performing GS and GWAS studies and results can subsequently be applied to either breed.

Conclusions

Our results indicate that at least 50K and 150K of evenly spaced SNP are necessary to delineate effective association and genomic selection studies, respectively in the Hereford and Braford populations analyzed. QTL within SNP distances < 50Kb are expected to have similar effects in both breeds due to high persistence of phase and therefore indicate that Hereford and Braford data can be pooled into a single reference population when GS and GWAS studies are performed with the above mentioned marker densities.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PB: data analysis, interpretation, and primary author of the manuscript; CCGG: experimental design, data collection and manuscript revision; ARC: data analysis and manuscript revision; JPS: helped with data analysis and manuscript revision; FFC: *Ne*

R script development, data analysis, interpretation and manuscript revision. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Research supported by CNPq – National Council for Scientific and Technological Development grant 478992/2012-2, Embrapa – Brazilian Agricultural Research Corporation grants 02.09.07.004 and 01.11.07.002, and CAPES – Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel grant PNPB 02645/09-2. Authors acknowledge the Delta G Connection and Gensys Associated Consulting for providing the data for this research.

References

1. Dekkers JCM. **Application of Genomics Tools to Animal Breeding.** *Current Genomics* 2012, **13**:207-212.
2. Schaeffer LR: **Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle.** *J Anim Breed Genet* 2006, **123**:218-223.
3. Konig S, Simianer H, Willam A: **Economic evaluation of genomic breeding programs.** *J Anim Sci* 2009, **92**:382-391.
4. Goddard ME, Hayes BJ: **Genomic selection based on dense genotypes inferred from sparse genotypes.** In: *Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 2009, Barossa Valley, Australia: Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, 26-29.
5. Hayes BJ, Lewin HA, Goddard ME: **The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation.** *Trends Genet* 2013, **29**(4):206-214.

6. Pritchard JK, Rosenberg NA: **Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies.** *Am J Hum Gen* 1999, **65**:220-228.
7. Sabeti PC, Varilly P, Fry B, Lohmueller J, Hostetter E, et al.: **Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations.** *Nature* 2007, **449**:913-918.
8. Smith LP, Kuhner MK: **The limits of fine-scale mapping.** *Genet Epidemiol* 2009, **33**:344-356.
9. Nielsen R: **Molecular signatures of natural selection.** *Annu Rev Genet* 2005, **39**:197-218.
10. McKay SD, Schnabel RD, Murdoch BM, Matukumalli LK, Aerts J, et al: **Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle.** *BMC Genet* 2007, **8**:74.
11. Bohmanova J, Sargolzaei M, Schenkel FS: **Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins.** *BMC Genomics* 2010, **11**:421.
12. Rexroad CE, Vallejo RL: **Estimates of linkage disequilibrium and effective population size in rainbow trout.** *BMC Genet* 2009, **10**:83.
13. Scraggs E, Zanella R, Wojtowicz A, Taylor JF, Gaskins CT, et al: **Estimation of inbreeding and effective population size of fullblood wagyu cattle registered with the American Wagyu Cattle Association.** *J Anim Breed Genet* 2014, **131**:3-10.
14. de Roos APW, Hayes BJ, Spelman RJ, Goddard ME: **Linkage Disequilibrium and Persistence of Phase in Holstein–Friesian, Jersey and Angus Cattle.** *Genetics* 2008, **179**(3):1503-1512.

15. Hickey JM, Kinghorn BP, Tier B, van der Werf JHJ, Cleveland MA: **A phasing and imputation method for pedigreed populations that results in a single-stage genomic evaluation.** *Genet Sel Evol* 2012, **44**:9.
16. Weigel KA, de los Campos G, Vazquez AI, Rosa GJM, Gianola D, van Tassell CP: **Accuracy of direct genomic values derived from imputed single nucleotide polymorphism genotypes in Jersey cattle.** *J Dairy Sci* 2010, **93**:5423-5435.
17. Zhang Z, Druet T: **Marker imputation with low-density marker panels in Dutch Holstein cattle.** *J Dairy Sci* 2010, **93**:5487-5494.
18. Erbe M, Hayes BJ, Matukumalli LK, Goswami S, Bowman PJ, et al: **Improving accuracy of genomic predictions within and between dairy cattle breeds with imputed high-density single nucleotide polymorphism panels.** *J Dairy Sci* 2012, **95**(7): 4114-4129.
19. Delta G Connection. Institutional. 2007. http://www.deltag.com.br/pt_br/pg_institucional.php. Accessed 10 Feb 2015.
20. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
21. Sargolzaei M, Chesnais JP, Schenkel FS: **Fimpute - an efficient imputation algorithm for dairy cattle populations.** *J Dairy Sci* 2011, **94**:421.
22. Sun C, Wu X-L, Weigel KA, Rosa GJM, Bauck S, et al: **An ensemble-based approach to imputation of moderate-density genotypes for genomic selection with application to Angus cattle.** *Genet Res* 2012, **94**:33-150.
23. Hill WG, Robertson A: **Linkage disequilibrium in finite populations.** *Theor Appl Genet* 1968, **38**:226-231.

24. Badke YM, Bates RO, Ernst CW, Schwab C, Steibel JP: **Estimation of linkage disequilibrium in four US pig breeds.** *BMC Genomics* 2012, **13**:24.
25. Uimari P, Tapio M: **Extent of linkage disequilibrium and effective population size in Finnish Landrace and Finnish Yorkshire pig breeds.** *J Anim Sci* 2011, **89**(3):609-614.
26. Sved JA: **Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations.** *Theor Popul Biol* 1971, **2**:125-151.
27. Qanbari S, Pimentel ECG, Tetens J, Thaller G, Lichtner P, et al: **The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle.** *Anim Genet* 2010, **41**:346-356.
28. Jiang Q, Wang Z, Moore SS, Yang RC: **Genome-wide analysis of zygotic linkage disequilibrium and its components in crossbred cattle.** *BMC Genet* 2012, **13**:65.
29. Corbin LJ, Blott SC, Swinburne JE, Vaudin M, Bishop SC, et al: **Linkage disequilibrium and historical effective population size in the Thoroughbred horse.** *Animal Genetics* 2010, **41**(Suppl. 2): 8-15.
30. McRae AF, McEwan JC, Dodds KG, Wilson T, Crawford AM, Slate J: **Linkage Disequilibrium in Domestic Sheep.** *Genetics* 2002, **160**:1113-1122.
31. Aerts J, Megens HJ, Veenendaal T, Ovcharenko I, Crooijmans R, et al: **Extent of linkage disequilibrium in chicken.** *Cytogenet Genome Res* 2007, **117**:338-345.
32. Hill WG: **Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium.** *Genet Res* 1981, **38**:209-216.
33. Beghain J, Boitard S, Weiss B, Boussaha M, Gut I, Rocha D: **Genome-wide linkage disequilibrium in the Blonde d'Aquitaine cattle breed.** *J Anim Breed Gen* 2012, **130**:294-302.

34. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M: **Patterns of linkage disequilibrium in the human genome.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:299-309.
35. Du FX, Clutter AC, Lohuis MM: **Characterizing linkage disequilibrium in pig populations.** *Int J Biol Sci* 2007, **3**:166-178.
36. Utsunomiya YT, Bomba L, Lucente G, Colli L, Negrini R, et al: **Revisiting AFLP fingerprinting for an unbiased assessment of genetic structure and differentiation of taurine and zebu cattle.** *BMC Genet* 2014, **15**:47.
37. Espigolan R, Baldi F, Boligon AA, Souza FRP, Gordo DGM, et al: **Study of whole genome linkage disequilibrium in Nelore cattle.** *BMC Genomics* 2013, **14**:305.
38. Villa-Angulo R, Matukumalli L, Gill C, Choi J, Van Tassell C, Grefenstette J: **High-resolution haplotype block structure in the cattle genome.** *BMC Genet* 2009, **10**:19-31.
39. Tenesa A, Navarro P, Hayes BJ, Duffy DL, Clarke GM, et al: **Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium.** *Genome Res* 2007, **17**(4):520-526.
40. Farnir F, Coppieters W, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, et al: **Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle.** *Genome Res* 2000, **10**:220-227.
41. Bovine HapMap Consortium: **Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds.** *Science* 2009, **324**(5926):528-532.
42. Hayes BJ, Lien S, Nilsen H, Olsen HG, Berg P, et al: **The origin of selection signatures on bovine chromosome 6.** *Anim Genet* 2008, **39**(2):105-111.
43. Sargolzaei M, Schenkel FS, Jansen GB, Schaeffer LR: **Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America.** *J Dairy Sci* 2008, **91**:2106-2117.

44. Piccoli ML, Braccini J, Cardoso FF, Sargolzaei M, Larmer SG, et al.: **Accuracy of genome-wide imputation in Braford and Hereford beef cattle.** *BMC Genetics* 2014, **15**:157

45. Daetwyler HD, Pong-Wong R, Villanueva B, Woolliams JA. **The impact of genetic architecture on genome-wide evaluation methods.** *Genetics* 2010, **185**(3): 1021-1031.

6 Artigo 2

Genome-wide association study for tick resistance in Hereford and Braford*

Patrícia Biegelmeyer¹, Vitor Catoia², Claudia C. G. Gomes³, Ignacio Aguilar⁴, Luciana C. A. Regitano⁵, Fernando Flores Cardoso^{1,3,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil

³Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Las Brujas, Canelones, Uruguay

⁵Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo Brazil

⁶Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil

Email addresses:

PB: patriciabiegel@gmail.com

VC: vi_nordi@hotmail.com

CCGG: claudia.gulias@embrapa.br

IA: iaguilar@inia.org.uy

LCAR: luciana.regitano@embrapa.br

FFC: fernando.cardoso@embrapa.br

Abstract

Background: Infestations on cattle by the tick *Boophilus (Rhipicephalus) microplus* impact negatively on animal production systems. The occurrence of genetic variability for tick counts within and between herds indicates the possibility of genetic progress by selecting resistant animals and the potential of this tool as a strategy to reduce the losses caused by the parasitism. The revolution in genotyping technologies and in quantification of gene expression on a large scale allows to combine the classical quantitative methodologies of animal breeding and molecular genetics, identifying genes that affect traits of interest or enabling new possibilities for genetic evaluation and selection. Genome-wide association studies (GWAS) are useful to investigate the genetic mechanisms that underlie the resistance by identifying the genes and metabolic pathways involved. The objective of this work was to identify genomic regions associated with tick resistance in Hereford and Braford cattle using the single-step GBLUP procedure, considering two scenarios: S1 (which iterates on SNP weights and SNP effect) and S2 (in which SNP weight and effects, and also animal effects were recomputed).

Results: The top 10 windows of 16 adjacent markers with largest fraction of variance explained 7.28% of additive genetic variance in S1, and 16.65% of variance in S2. A total of 37 SNP windows explaining above of 20% of genetic variance were observed in S1, and a total of 14 SNP windows in S2. Some peaks associated with high proportion of variance were identified as common to S1 and S2. No overlapping was observed between the top 10 windows of each scenario and previously reported QTL for tick resistance. Nonetheless, the four top 10 windows common to both scenarios were mapped close or within genes related to innate immune responses, inflammatory processes and others pathways.

Conclusions: Despite none of the top 10 SNP windows of S1 or S2 overlapped any QTL previously described to tick resistance in literature, they provide regions and genes which are potential candidates to be involved in the expression of tick resistance for further fine mapping studies. Due to the high complexity of tick resistance expression, more studies should be developed combining GWAS with other methods results for a better understanding about genes and pathways involved in the expression of resistance.

Background

The current need of auxiliary strategies to bovine tick control has stimulated researches to find more efficient and viable alternatives for cattle producers, due to several limitations related to conventional chemical control and others currently available methods [1]. Genetic resistance of animals have been increasingly studied as an alternative of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control. The genetic variability for tick counts within and between herds reported by our group [2] and many authors [3-7] indicates the possibility of genetic progress by selecting resistant animals and the potential of this tool as a strategy to reduce the losses caused by the parasitism [8].

The recent revolution in genotyping technologies and in quantification of gene expression on a large scale with the development of chips and DNA arrays allows to combine the classical quantitative methodologies of animal breeding and molecular genetics, identifying genes that affect traits of interest or enabling new possibilities for genetic evaluation and selection [9,10]. For complex traits, as tick resistance, this scenario represents the possibility to select more accurately resistant animals.

In genomic selection (GS), first reported by Meuwissen et al. [9], the genetic merit of animals is predicted using information from markers covering the whole genome, without a precise knowledge about QTL (*quantitative trait loci*) location or identification of the functional polymorphism. Genomic selection methods also allow the identification of genetically superior individuals before the collection of phenotypic data, accelerating the process of decision and selection and reducing costs [11,12].

In studies of genome-wide associations (GWAS), variations in DNA that are correlated to a certain phenotype are identified, allowing the detection of regions of chromosomes responsible for expression of the phenotype and a better understanding of physiological and biological mechanisms influencing complex traits [13-16]. Different statistical procedures have been proposed to correlate the genotype of SNP and the phenotype of interest [9,17-19] and analyzed as a method to increase the accuracy of markers effects estimates.

The single-step method of genomic BLUP (ssGBLUP) integrates phenotypic, genotypic and pedigree information, and has been indicated as a simpler and equally accurate alternative compared to methodologies of multiple steps, especially when historical data are available for incorporation in association studies [20-23]. Possibility

of incorporating phenotypes of animals not genotyped in analyzes, lower computational processing time and greater consistency and accuracy of estimates are advantages of ssGBLUP cited by some authors [23-26].

In beef cattle, there are still a few studies reporting the use of single-step method for genomic GBLUP. Using a simulated data of weaning weight for a purebred beef population, Lourenco et al. [27] related that accuracy gains could be expect for predictions from ssGBLUP over traditionally BLUP, especially as the number of genotyped animals increases. For tick resistance, a recent study of Cardoso et al. [2] determined the accuracy of genomic predictions obtained by different methods in Hereford and Braford breeds and reported values of moderate to high magnitude in Braford, and moderate to low accuracy values in Hereford. The objective of this work was to identify genomic regions associated with tick resistance in Hereford and Braford cattle using the single-step GBLUP procedure.

Methods

Phenotypic, genotypic and pedigree data

Analysis used the information of one to three tick counts on the whole left body side of 928 Hereford and 3,435 Braford (breed composition between $\frac{1}{2}$ Hereford + $\frac{1}{2}$ Zebu and $\frac{3}{4}$ Hereford + $\frac{1}{4}$ Zebu) bovines from eight commercial herds belonging to the Delta G Connection Genetic Improvement Consortium [28]. The counts were performed between 2010 and 2013, during an extended yearling evaluation period, with an average animal age of 524 ± 65 days.

From the total of 4,363 animals with phenotypic data, 3,545 were genotyped using Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, USA), which contains 54,609 SNP markers, and 131 sires of the data set were also genotyped with Illumina High-Density Bovine BeadChip Array (Illumina Inc., San Diego, USA), containing 777,962 SNP. Genotyping and quality control (QC) of the genotypes were performed using the GenomeStudio software (Illumina Inc. San Diego, CA), according to manufacturer's protocols. Genotypes with a Gen Call Score < 0.15 were set as missing genotypes. Pedigree information was composed of 12,050 records, including base animals with unknown parents.

Quality control

A quality control was implemented in the R program [29] using the snpStats package [30], to remove samples with call rate < 0.90, heterozygosity deviation > 3.0 standard deviations, with wrong sex and duplicated. For markers, only the SNP located on the bovine autosomes (BTA) were considered in further analyses. SNP with call rate < 0.98, minor allele frequencies (MAF) < 0.03 and highly significant deviation ($P < 10^{-6}$) from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were excluded by QC criteria. Moreover, for SNP in the same position only the one with highest MAF was retained. The high-density (HD) panel was filtered to select only the SNP also present in the 50K panel. After editing, a total of 41,045 SNP markers (78%) and 3,586 samples (98%) remained, including 131 sires, 2,803 Braford, and 652 Hereford yearling bulls, steers, and heifers with tick count records. Missing genotypes (0.86%) due to technology failure or QC editing, and in SNP that are present in the 50K but not in the HD panel were imputed using FImpute software [31].

Model and analyses

Log-transformed tick counts were analyzed to estimate breeding values with the ssGBLUP procedure using BLUPf90 family of programs [32], combining phenotypic, genotypic and pedigree data. The univariate repeated measures model used was

$$\mathbf{y} = \mathbf{1}\mu + \mathbf{Z}_1\mathbf{a} + \mathbf{Z}_2\mathbf{p} + \mathbf{e},$$

where \mathbf{y} = vector of observed phenotypes; $\mathbf{1}$ = vector of ones ; μ = general mean; \mathbf{Z} = incidence matrix relating phenotypes to individuals; \mathbf{a} = vector of individual animal effects; \mathbf{p} = vector of individual permanent environmental effects; \mathbf{e} = vector of residuals. The (co)variances of \mathbf{a} , \mathbf{p} and \mathbf{e} were assumed as

$$\text{var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{p} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{H}\sigma_a^2 & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{I}\sigma_p^2 & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{I}\sigma_e^2 \end{bmatrix},$$

where σ_a^2 , σ_p^2 and σ_e^2 = additive direct, permanent environmental and the residual variances, respectively; \mathbf{H} = matrix that combines pedigree and genomic information [21], and its inverse is

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix},$$

where \mathbf{A} = relationship matrix for all animals; \mathbf{A}_{22} = relationship matrix for genotyped animals; \mathbf{G} = genomic relationship matrix [33].

The animals effects of genotyped individuals are a function of SNP effects:

$$\mathbf{a}_g = \mathbf{Z}\mathbf{u},$$

where \mathbf{Z} = incidence matrix of genotypes for each locus, and \mathbf{u} = vector of markers effects. The variance of the animal effects is:

$$\text{var}(\mathbf{a}_g) = \text{var}(\mathbf{Z}\mathbf{u}) = \mathbf{Z}\mathbf{D}\mathbf{Z}'\sigma_u^2 = \mathbf{G}^*\sigma_a^2,$$

where \mathbf{D} = diagonal matrix with weights for variances of SNP (for GBLUP, $\mathbf{D} = \mathbf{I}$), σ_u^2 = genetic additive variance of SNP when no weights are present, and \mathbf{G}^* = weighted genomic relationship matrix.

The (co)variance of animal effects (\mathbf{a}_g) and SNP effects (\mathbf{u}) is

$$\text{var} \begin{bmatrix} \mathbf{a}_g \\ \mathbf{u} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{Z}\mathbf{D}\mathbf{Z}' & \mathbf{Z}\mathbf{D}' \\ \mathbf{D}\mathbf{Z}' & \mathbf{D} \end{bmatrix} \sigma_u^2,$$

and

$$\mathbf{G}^* = \frac{\text{var}(\mathbf{a}_g)}{\sigma_a^2} = \frac{\text{var}(\mathbf{Z}\mathbf{u})}{\sigma_a^2} = \mathbf{Z}\mathbf{D}\mathbf{Z}' \frac{\sigma_u^2}{\sigma_a^2} = \mathbf{Z}\mathbf{D}\mathbf{Z}'\lambda,$$

where λ = weighting factor. According to VanRaden et al. [33],

$$\lambda = \frac{\sigma_u^2}{\sigma_a^2} = \frac{1}{\sum_{i=1}^M 2p_i(1-p_i)},$$

where M = number of SNP, and p_i = allele frequency of the second allele in the i^{th} marker. The SNP effect estimates ($\hat{\mathbf{u}}$) were obtained as a function of the predicted breeding values, using the formula [34]:

$$\hat{\mathbf{u}} = \frac{\sigma_u^2}{\sigma_a^2} \mathbf{D}\mathbf{Z}'\mathbf{G}^{*-1} \hat{\mathbf{a}}_g.$$

Therefore, the equation for predicting SNP effects which uses weighted genomic relationship matrix \mathbf{G}^* corresponds to

$$\hat{\mathbf{u}} = \lambda \mathbf{DZ}'\mathbf{G}^{*-1}\hat{\mathbf{a}}_g = \mathbf{DZ}'[\mathbf{ZDZ}']^{-1}\hat{\mathbf{a}}_g.$$

Estimates of SNP effects were used to estimate individual variance of each SNP effect, as described by Zhang et al. [35]:

$$\hat{\sigma}_{u,i}^2 = \hat{u}_i^2 2\rho_i(1-\rho_i).$$

Considering t as an iteration number and i as the i^{th} SNP, the vector $\hat{\mathbf{u}}$ and the matrix \mathbf{D} were iteratively recomputed using the following algorithm [23]:

1. $t = 0, \mathbf{D}_{(t)} = \mathbf{I}; \mathbf{G}_{(t)}^* = \mathbf{ZD}_{(t)}\mathbf{Z}'\lambda.$
2. Compute $\hat{\mathbf{a}}_g$ by ssGBLUP.
3. Calculate $\hat{\mathbf{u}}_{(t)} = \lambda \mathbf{D}_{(t)}\mathbf{Z}'\mathbf{G}_{(t)}^{*-1}\hat{\mathbf{a}}_g.$
4. Calculate $d_{i(t+1)}^* = \hat{u}_{i(t)}^2 2\rho_i(1-\rho_i)$ for all i [35].
5. Normalize $\mathbf{D}_{(t+1)} = \frac{\text{tr}(\mathbf{D}_{(0)})}{\text{tr}(\mathbf{D}_{(t+1)}^*)} \mathbf{D}_{(t+1)}^*.$
6. Calculate $\mathbf{G}_{(t+1)}^* = \mathbf{ZD}_{(t+1)}\mathbf{Z}'\lambda.$
7. $t = t + 1.$
8. Exit, or loop to step 2 or 3.

In scenario 1 (S1, looping to step 3), the revised \mathbf{G}^* is applied only for the prediction of SNP effects. In scenario 2 (S2, looping to step 2), both animal and SNP effects are recomputed during iterations. The algorithm was run over three iterations [26]. Analyses were performed using the BLUPF90 family programs [32] modified to account for genomic information [21].

QTL mapping

To identify potentially important genomic regions affecting tick resistance, the percentage of genetic variance explained by consecutive and non-overlapping windows of 16 markers were analyzed. This length of windows was chosen in order to

compare our results with those obtained by Sollero et al. [36] in a parallel study with the same dataset, in which genomic segments of 1 Mb (containing on average ~16 SNP) were associated with tick resistance by Bayesian methods. Even though there is an option to use 1 Mb windows through the programs used in our methodology, the definition of such windows and choice of starting point was unclear and inconsistent between runs; therefore, we opted a window definition base on a fixed number of markers, that is with 16 SNP.

The top 10 windows with largest proportion of variance in each scenario were submitted to the database available in the "National Center for Biotechnology Information", to inspect QTLs in the same genomic regions in the Animal QTL database [37], using physical map order derived from bovine genome assembly UMD 3.1 [38]. The Map Viewer tool was used to search for candidate genes within the top 10 windows with largest variance and in common to S1 and S2. The presence of QTL and genes in the neighboring windows (1 Mb to the right and 1 Mb to the left in map) was also examined. Biological function and pathways in which genes within these regions are involved were investigated using the softwares "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID) [39] and "Gene Ontology" (GO) [40].

Results

To verify the occurrence of association between genomic regions with QTLs, 2,578 non-overlapping windows were generated. In order to use the information of all the 41,045 SNP available after quality control, 27 windows located in the final region of almost all chromosomes contained less than 16 SNP (Table 1).

Table 1 – Windows with less than 16 SNP generated from the 41,045 markers available after quality control

n SNP ¹	Local of occurrence (Chr_Mb) ²	n SNP	Local of occurrence (Chr_Mb)
1	23_52	8	13_83, 16_80
2	1_158, 3_121	10	19_63, 21_70
3	9_105	11	14_84, 17_74, 24_61, 26_51
4	18_65, 25_42, 29_50	12	2_136, 15_84
5	27_45	13	28_45
6	8_113	15	4_119, 6_118, 10_103, 12_90
7	7_112, 11_106, 20_71		

¹Number of SNP in window; ²Chr = chromosome; Mb = start position (Mb) of window within the chromosome.

Figure 1 shows *Manhattan plots* from genetic variance explained by SNP windows in S1 and S2 after 1, 2 and 3 iterations. In both scenarios, iterations increased weights of SNP with large effects and decrease those with small effects. Please note that plots of first iteration are always identical for S1 and S2. In third iteration, some regions with great influence on tick resistance were detected in both scenarios, especially in BTA6, BTA8 and BTA13 in S1 (Figure 1C), and in BTA5, BTA6, BTA13 and BTA15 in S2 (Figure 1E).

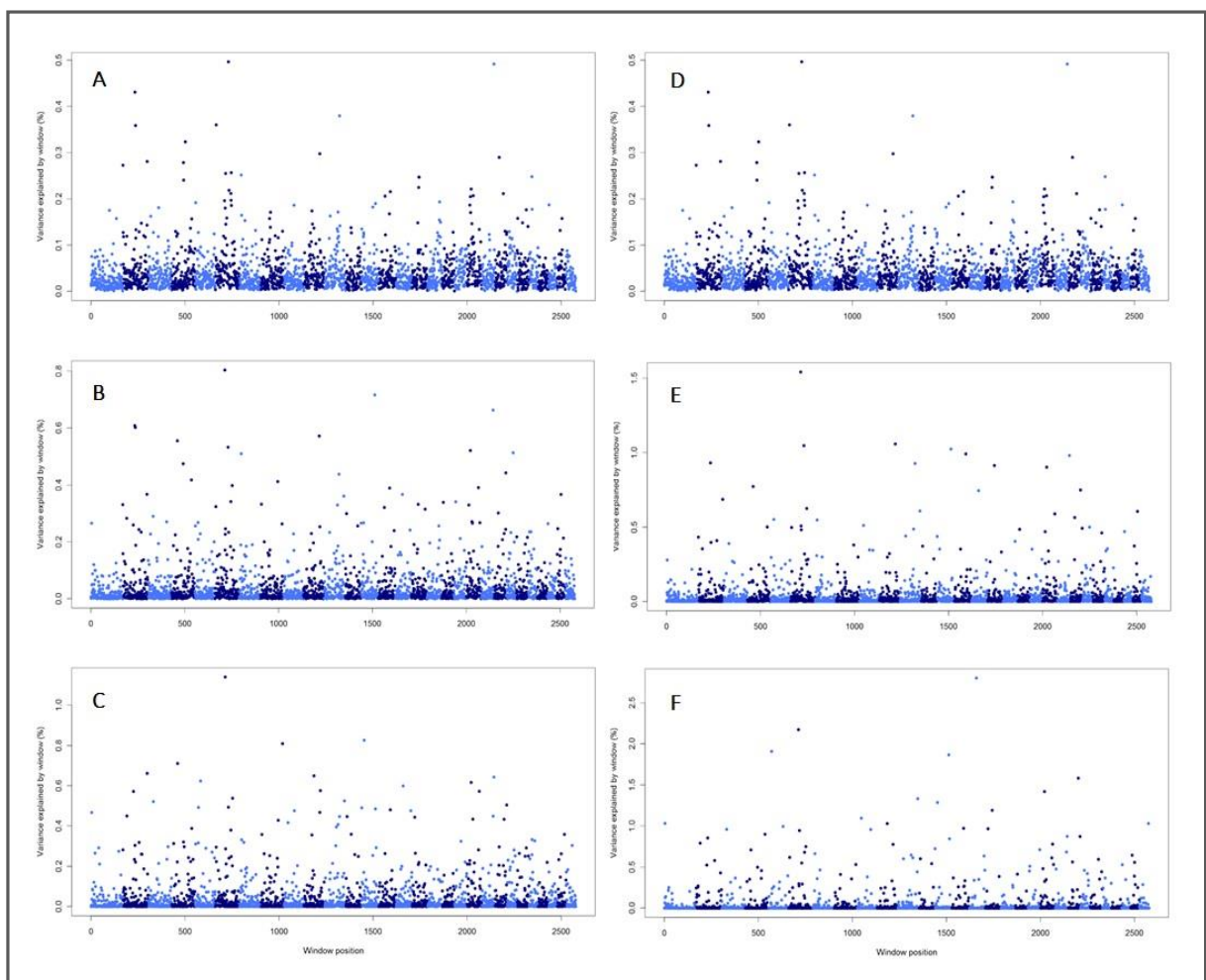


Figure 1 - *Manhattan plots* for percentage of additive genetic variance explained by 16 SNP windows for tick resistance obtained by ssGBLUP/S1 after the first (1A), second (1B) and third (1C) iteration, and by ssGBLUP/S2 after the first (1D), second (1B) and third (1F) iteration. The x-axis represents location of 16 SNP window. The y-axis represents the proportion of variance of 2,578 SNP windows.

Figure 2 present *Manhattan plots* with SNP effects solutions obtained in S1 and S2 after 1, 2 and 3 iterations. Similarly to Figure 1, the peaks associated with the

largest effect of SNP become more distinct as the iterations progresses. Nevertheless, graphs with SNP effects were noisier than plots with windows of SNP (Figure 1), in both scenarios and after all iterations.

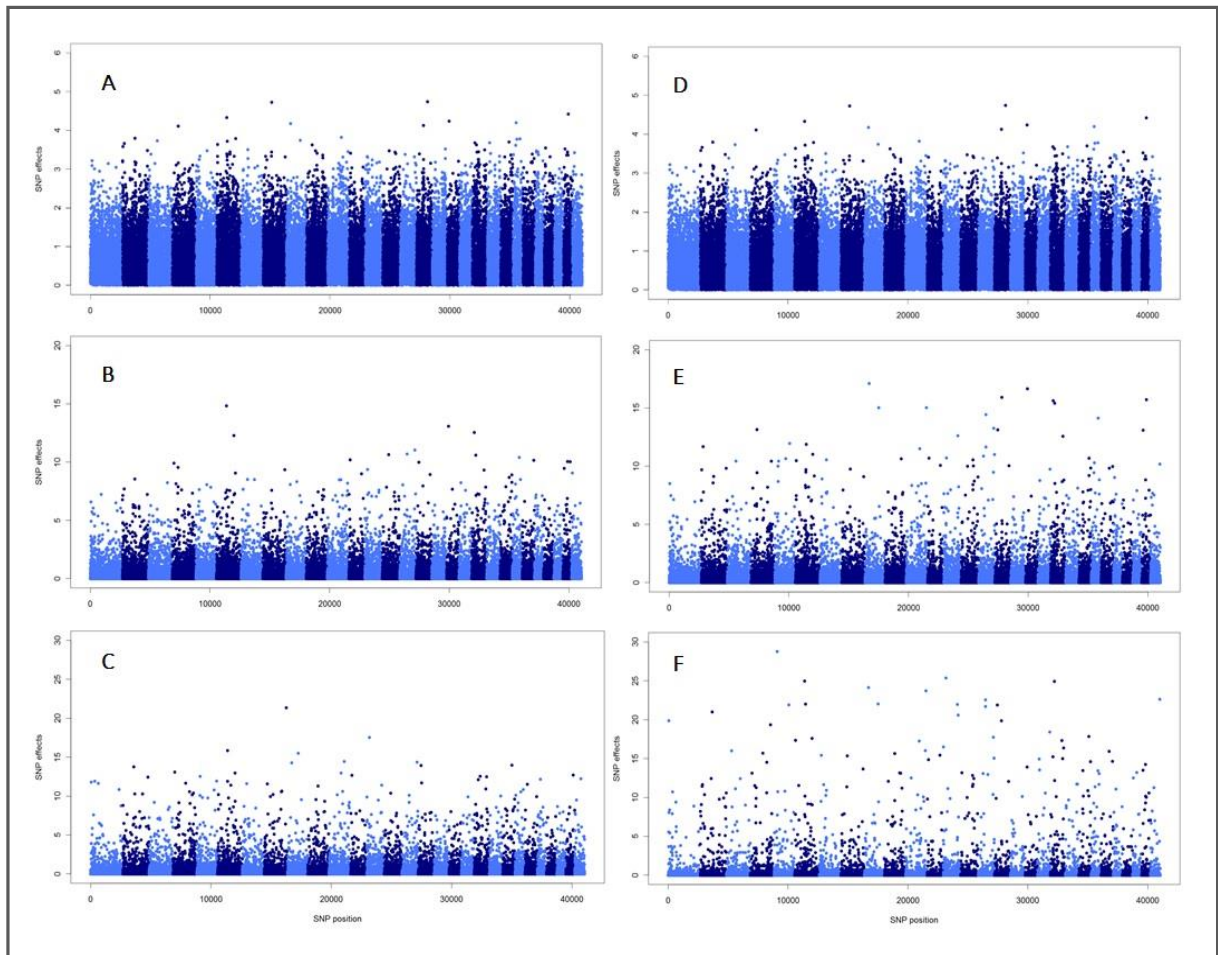


Figure 2 - *Manhattan plots* for SNP effects solutions for tick resistance obtained by ssGBLUP/S1 after the first (2A), second (2B) and third (2C) iteration, and by ssGBLUP/S2 after the first (2D), second (2E) and third (2F) iteration. The x-axis represents SNP location. The y-axis represents the solutions effects of 41,045 SNP.

The proportion of additive genetic variance in tick resistance explained by the top 10 SNP windows was equal to 7.28% in S1 and to 16.65% in S2, considering three iterations (Table 2). In S1, only one window explaining above of 1% (1.14%) of variance for tick resistance was observed. In contrast for S2, 13 SNP windows explaining above of 1% of variance for tick resistance were observed. The proportion of genetic variance jointly explained by these windows was equal to 19.72%.

Table 2 - Top 20 windows explaining the highest proportion of additive genetic variance for tick resistance obtained by S1 (iterates on SNP weights and SNP effects) and S2 (iterates on SNP weights and SNP and animal effects) in the third iteration

Obs	S1			S2		
	Chr_Mb ¹	Var (%) ²	Cumulative Var (%)	Chr_Mb	Var (%)	Cumulative Var (%)
1	6_48	1.14	1.14	15_36	2.80	2.80
2	13_13	0.83	1.97	6_48	2.17	4.97
3	8_107	0.81	2.78	5_13	1.91	6.88
4	4_30	0.71	3.49	13_70	1.87	8.74
5	2_131	0.66	4.15	22_52	1.58	10.33
6	10_51	0.65	4.8	20_17	1.42	11.74
7	21_64	0.64	5.44	11_100	1.33	13.07
8	5_29	0.62	6.06	13_13	1.29	14.36
9	20_17	0.62	6.68	16_38	1.19	15.55
10	15_36	0.6	7.28	9_22	1.09	16.65
11	10_85	0.58	7.85	1_2	1.03	17.68
12	20_59	0.57	8.42	29_48	1.03	18.71
13	2_53	0.57	9.0	10_51	1.03	19.73
14	6_89	0.54	9.54	5_88	0.99	20.73
15	11_100	0.52	10.06	14_53	0.97	21.70
16	3_30	0.52	10.58	16_16	0.96	22.66
17	22_58	0.5	11.08	3_30	0.96	23.62
18	6_64	0.49	11.57	9_72	0.96	24.58
19	5_14	0.49	12.06	6_52	0.94	25.52
20	3_30	0.49	12.58	4_102	0.90	26.42

¹Chr = chromosome; Mb = start position (Mb) of window within the chromosome; ²Var = additive genetic variance explained by the 16 SNP window

Among the top 10 windows in S1, there were four windows in common with S2 (6_48, 13_13, 15_36 and 20_17). These regions explained 3.19% of the additive genetic variance in S1, and 7.67% of the variance in S2. Among the top 10 windows in S1 or S2, there were, respectively, five and six regions in common with the top 10 windows described by Sollero et al. [36]. For S1, regions in common were 6_48, 13_13, 10_51, 15_36 and 20_17. For S2, regions in common were 5_13, 6_48, 11_100, 13_13, 15_36 and 20_17. Sollero et al. [36] reported that their top 10 windows explained 8.95% of the variance for tick resistance.

No overlapping was observed between top 10 windows and QTLs previously related to tick resistance, according to QTL database. Considering the ranking windows detected in both scenarios of ssGBLUP, we observed that Window 6_48 was related to QTLs for shear force [41] and clinical mastitis [42], and neighbored a QTL for fatty acid content in meat [43]. Window 13_13 was related to QTL for susceptibility to infectious bovine keratoconjunctivitis [44], and was found neighboring QTLs for calving index and stillbirth maternal [45]. Region 15_36 was related to QTLs for shear force [41], body weight and *Longissimus dorsi* muscle area [46]. Window 20_17 was

related to QTLs for heat tolerance [47], shear force [41], *Longissimus dorsi* muscle area [14,48], fat thickness at the 12th rib and intramuscular fat [48]. This region on BTA20 also neighbored QTLs for coat texture [49] and calf size and calving index [45,50].

A total of 19 genes and pseudo-genes were detected within the four top 10 windows common to both ssGBLUP scenarios (Table 3), and 56 genes and pseudo-genes were identified neighboring (1 Mb to the left and right) these four top 10 windows (Table 4).

Table 3 - Annotated genes within the four windows ranked as top 10 for both scenarios S1 (iterates on SNP weights and SNP effects) and S2 (iterates on SNP weights and SNP and animal effects)

Chr_Mb ¹	N ²	Genes ³
6_48	0	-
13_13	3	LOC104973710, LOC1049737101, VAMP7
15_36	5	SOX6, LOC104974233, LOC1049742334, LOC1049742335, TRNAW-CCA
20_17	11	LOC104975232, LOC104975230, ZSWIM6, MIR2889, LOC101909218, LOC104975233, LOC100301415, NDUFAF2, LOC101907741, NDUFAF2, ERCC8

¹Chr = chromosome; Mb = start position (Mb) of window within the chromosome; ²N = number of genes within the window; ³Genes = NCBI symbol of annotated genes in genome using the *Bos taurus* UMD3.1 assembly.

Table 4 - Annotated genes neighboring (1 Mb to left and right) the four windows ranked as top 10 for both scenarios S1 (iterates on SNP weights and SNP effects) and S2 (iterates on SNP weights and SNP and animal effects)

Chr_Mb ¹	N ²	Genes ³
6_47 / 6_49	4	TRNAS-GGA, LOC100298058, STIM2, LOC101908348
13_12 / 13_14	11	LOC519069, LOC104973713, LOC104973714, ECHDC3, LOC104973712, LOC101907356, USP6NL, LOC104973708, LOC104973709, CELF2, MIR7861
15_35 / 15_37	20	LOC104974236, LOC104974237, INSC, CT, CALCA, TRNAY-GUA, LOC104974254, CALCB, LOC784945, CYP2R1, LOC104974238, PDE3B, TRNAC-GCA, PIK3C2A, LOC101904314, RPS13, PLEKHA7, C15H11orf58, LOC101904740, SOX6
20_16 / 20_18	21	ERCC8, ELOVL7, LOC100295294, LOC104975234, DEPDC1B, LOC104975237, LOC100848933, PDE4D, LOC101903569, LOC101904484, LOC101907219, IPO11, DIMT1, KIF2A, TRNAR-GCG, LOC101907266, LOC104975229, TRNAG-CCC, LOC104975232, LOC781741, LOC104975231

¹Chr = chromosome; Mb = start position (Mb) of window within the chromosome; ²N = number of genes neighboring the window; ³Genes = NCBI symbol of annotated genes in genome using the *Bos taurus* UMD3.1 assembly.

Functional enrichment of these genes resulted in the identification of pathways related to innate immune system, e.g., involved in the transport of proteins from endosome to lysosome, in exocytosis of mediators during eosinophil and neutrophil degranulation and targeting cell killing by natural killer cells. Genes within or neighboring these top windows also were found to be related to biological process as regulation of cellular response to stress, cell activation in response to an activating factor (such as a cellular or soluble ligand), vascular processes in circulatory system, regulation of calcium concentrations in the cytosol and endoplasmic reticulum, metabolism of insulin, cell receptor signaling. Genes producing regulatory proteins involved in the synthesis of cholesterol, steroids and other lipids, and in molecular functions, as in oxidation-reduction reactions and as cellular components, being integral components of membrane, were also observed.

Discussion

Considering the polygenic nature of tick resistance [5], it is not expected that a few regions of genome would be responsible for capturing large proportion of the variance attributed the expression of the phenotypes. Therefore, it makes no sense greatly increase the number of iterations to obtain windows with higher variance. After each round, weights of SNP with large effects are increase and those with small effects are decrease, in both scenarios (Figures 1 and 2). As a result, solutions in later rounds will be more similar to those expected from an oligogenic trait [26]. In fact, some authors reported that the excessive weights on SNP effects in later iterations were related to decreases of accuracies in QTL detection, and that a few iterations is sufficient to provide the most accurate identification of the top QTLs [23,51]. Wang et al. [26] indicated that three iterations are sufficient to shrink toward zero the effect of supposedly unimportant markers.

Due to the high ratio between the number of SNP and the number of genotyped individuals, the plots of association between phenotypes and the variance explained by SNP (Figure 2) were noisier than graphs with solutions for variance of windows of SNP (Figure 1). The use of single markers was also pointed as suboptimal manner to identify accurately QTLs [18,23,51,52]. According to Villumsen et al. [53], depending

on the marker density and levels of linkage disequilibrium in the population, there should be an optimal haplotype length to be use as a better predictor of its neighboring QTL. Goddard (2009) related that the effective population size of population may influence this optimal window size.

Despite some difference in the window definition (respectively, 16 SNP and 1 Mb segments), we observed a relative concordance in the ranking of the top 10 windows obtained by ssGBLUP (our S1 and S2) and BayesB [36] methods applied to this tick count dataset. These findings are in agreement with those reported by Wang et al. [26], comparing ssGBLUP/S1, ssGBLUP/S2, single-marker model (CGWAS), and BayesB for GWAS in a broiler chicken data. Investigating with 20 SNP windows and using three iterations in single-step GBLUP, they reported that in ssGBLUP/S1, there were 2, 4, and 6 windows in common, respectively, with ssGBLUP/S2, CGWAS, and BayesB. For the top 10 windows in BayesB, there were 6, 1, and 3 in common, respectively, with ssGBLUP/S1, ssGBLUP/S2 and CGWAS [26].

Although the ranking of top regions was similar between our results and those obtained by Sollero et al. [36], we observed that the proportion of genetic variance explained by top windows in ssGBLUP/S1 and BayesB (7.28% and 8.95%, respectively) were considerably less than the variance captured by the top windows in ssGBLUP/S2 (16.65%). These results contradicted the statement of Wang et al. [26], saying that it is always expected a greater proportion of genetic variance assigned by BayesB to SNP effects in any GWAS comparison. In their study with broiler chickens, the variances explained by top 10 windows with 20 SNP in ssGBLUP/S1, ssGBLUP/S2 and BayesB were, respectively, 8.95%, 15.18% and 33.26%.

The ssGBLUP/S1 method for genome association studies seemed to be more useful compared with CGWAS and BayesB methodologies in the situations where a large number of phenotyped animals are not genotyped, and obtaining deregressed proofs is difficult or impossible [26]. Studies with simulated data using ssGBLUP [23] and of a similar GBLUP method [54,55] showed that ssGBLUP/S1 was more appropriate for identification of SNP markers with largest effects, while ssGBLUP/S2 was suitable for more accurate estimation of genomic breeding values. It is important to note that when studies to compare different methods for GWAS are conducted with real data, the true values are unknown, so it is not possible to indicate which methodology is most accurate [26]. One reason for the disagreement between results

of simulated and real data could be that the genetic architecture of simulations is significantly different from what is found in real populations [56].

According to Wang et al. [23], the possibility to incorporate phenotypes of ungenotyped animals without computing pseudo-data may be the main advantage of ssGBLUP for GWAS. Moreover, comparing the results of application of ssGBLUP, BayesB and CGWAS, the authors also reported that ssGBLUP methods were faster, more accurate and easier to implement for GWAS applications. On the other hand, the absence of a methodology for testing the significance of SNP effects in ssGBLUP is a weakness of this method [26]. Hence, there is a need for more research to be done to determine the level of significance in ssGBLUP/S1 or ssGBLUP/S2.

The polygenic architecture of the analysed trait is considered by GBLUP methods to the construction of the G matrix, where information of all SNP is included. Bayesian methods, conversely, often assume that a reduced number of SNP explains the genetic variance, among which some have a small or no effect [57,58]. In analysis of traits controlled by a few genes, the polygenic model assumption could be a disadvantage, because the number of QTLs is smaller than the number of effective independent chromosomal segments [59]. In these cases, Bayesian inferences can be more adequate than the GBLUP method [56]. A disadvantage of Bayesian inference in association studies may be that the use of priors values, which determine the shrinkage on SNP effect estimates and dominate the inference in analysis with a large number of marker effects to estimate but few observations available [60,61]. Moreover, typically Bayesian procedures perform inferences via Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm, which have as disadvantage the computing time required for parameters estimation [62].

Even no overlapping was observed between our regions with highest genetic variance and the QTLs described in literature, it is important to note that tick resistance has few regions registered in cattle QTL database and no major gene detected [5,63-65]. Factors such as experimental design, genetic composition of populations, season of evaluation of phenotypes, and type of genetic markers used were reported as possible reasons for differences between studies [66]. The nineteen QTLs described were identified on chromosomes 2, 3, 5, 7, 10, 11, 14, 23 and 27 [5,63-65]. Using chips of 10K to genotype animals of six composed dairy breeds, several genomic regions were identified in diverse chromosomes by Barendse [67] and Turner et al. [68]. Porto

Neto et al. [69] used meta-analysis to combine results of GWAS [67,68] and gene expression [70] for tick resistance, and confirmed overlapping of significant regions on BTAs 2, 3, 10, 13 and 19.

Genes involved in the expression of tick resistance in bovines are far from clarified, and many studies have been developed to elucidate questions related to the innate [4,71-73] and acquired immunity [74-77]. Our results demonstrated that immune related pathways were associated with tick resistance, as many others pathways, reinforcing the idea that the host resistance is consequence of diverse physiological mechanisms. The method of single-step GBLUP for GWAS provided a general framework that can be explored in order to investigate the genetic architecture of resistance. A better knowledge of the molecular basis of complex traits can generate new opportunities for effectiveness genomic and marker-assisted selection process, leading to economic benefits to the beef production industry.

Conclusions

In the present genome-wide association study, we associated genetic variance of SNP windows to cattle tick resistance in two scenarios of single-step GBLUP for GWAS. Some peaks associated with high proportion of variance were identified as common to ssGBLUP/S1 and ssGBLUP/S2, and also to top regions reported by a parallel study of GWAS using BayesB method in the same data. Despite, none of the top 10 SNP windows of ssGBLUP/S1 or ssGBLUP/S2 overlapped any QTL previously described to tick resistance in literature, they provide candidate regions and candidate genes for further fine mapping studies. These windows were mapped within or near genes related to diverse pathways, including innate immune response pathways. Due to the high complexity of tick resistance expression, more studies should be developed combining GWAS with other methods results (e.g. gene expression) for a better understanding about genes and pathways involved in the expression of resistance. Finally, GWAS results should be carefully interpreted, and potential causative effects should be previously validated in further assays considering similar population structure, before effective marker assisted selection processes can be implemented.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PB: data analysis, interpretation, and primary author of the manuscript; VC: ; CCGG: experimental design, data collection and manuscript revision; IA: manuscript revision; LCAR: ; FFC: data analysis, interpretation and manuscript revision. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Research supported by CNPq – National Council for Scientific and Technological Development grant 478992/2012-2, Embrapa – Brazilian Agricultural Research Corporation grants 02.09.07.004 and 01.11.07.002, and CAPES – Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel grant PNPd 02645/09-2. Authors acknowledge the Delta G Connection and Gensys Associated Consulting for providing the data for this research.

References

1. Siqueira F, Cardoso FF, Gullias-Gomes CC, Regitano LCA, Machado MA. Resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Andreotti R, Koller WW, editors. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças Transmitidas. Brasília: Embrapa; 2013. p. 87-104.
2. Cardoso FF, Gomes CCG, Sollero BP, Oliveira MM, Roso VM, et al. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. J Anim Sci. 2015;93:1-13.
3. Henshall JM. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. Aust J Agric Res. 2004;55:1109-16.

4. Fraga AB, Alencar MM, Figueiredo LA, Razook AG, Cyrillo JNSG. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). Rev Bras Zootec. 2003;32 Suppl 1:1578-86.
5. Machado MA, Azevedo ALS, Teodoro RL, Pires MA, Peixoto MGCD, et al. Genome-wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). BMC Genom. 2010;11:1-11.
6. Hüe T, Hurlin JC, Teurlai M, Naves M. Comparison of tick resistance of crossbred Senepol x Limousin to purebred Limousin cattle. Trop Anim Health Prod. 2014;46:447-53.
7. Passafaro TL, Carrera JPB, Santos LL, Raidan FSS, Santos DCC, et al. Genetic analysis of resistance to ticks, gastrointestinal nematodes and *Eimeria* spp. in Nellore cattle. Vet Parasitol. 2015;210:224-34.
8. Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2014;23:150-56.
9. Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of total genetic value using genome wide dense marker maps. Genetics. 2001;157(4):1819-29.
10. Goddard ME, Hayes BJ. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programs. Nat Rev Genet. 2009;10(6):381-91.
11. Goddard ME, Hayes BJ. Genomic selection. J Anim Breed Genet. 2007;124(6):32-30.
12. Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. Accelerating improvement of livestock with genomic selection. Annu Rev Anim Biosci. 2013;1(1):221-37.

13. Cole JB, Wiggans GR, Ma L, Sonstegard TS, Lawlor TJ, et al. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. *BMC Genom.* 2011;12:408-65.
14. Peters SO, Kizilkaya K, Garrick DJ, Fernando RL, Reecy JM, et al. Bayesian genome-wide association analysis of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. *J Anim Sci.* 2012;90(10):3398-409.
15. Costa RB, Camargo GMF, Diaz IDPS, Irano N, Dias MM, et al. Genome-wide association study of reproductive traits in Nellore heifers using Bayesian inference. *Genet Sel Evol.* 2015;47:67.
16. Kim ES, Sonstegard TS, da Silva MV, Gasbarre LC, Van Tassell CP. Genome-wide scan of gastrointestinal nematode resistance in closed Angus population selected for minimized influence of MHC. *PLoS ONE.* 2015;10:3.
17. de los Campos G, Naya H, Gianola D, Crossa J, Legarra A, et al. Predicting quantitative traits with regression models for dense molecular markers and pedigree. *Genetics.* 2009;182:375-85.
18. Habier D, Fernando RL, Kizilkaya K, Garrick D. Extension of the Bayesian alphabet for genomic selection. *BMC Bioinf.* 2011;12:186.
19. Park T, Casella G. The Bayesian lasso. *J Am Stat Assoc.* 2008;103:681-86.
20. Misztal I, Legarra A, Aguilar I. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *J Dairy Sci.* 2009;92(9):4648-55.
21. Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, et al. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J Dairy Sci.* 2010;93(2):743-52.

22. Christensen OF, Lund MS. Genomic prediction when some animals are not genotyped. *Genet Sel Evol.* 2010;42:2.
23. Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir WM. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genet Res.* 2012;94(2):73-83.
24. Chen CY, Misztal I, Aguilar I, Tsuruta S, Meuwissen THE, et al. Genome-wide marker-assisted selection combining all pedigree phenotypic information with genotypic data in one step: an example using broiler chickens. *J Anim Sci.* 2011;89(1):23-28.
25. Forni S, Aguilar I, Misztal I. Different genomic relationship matrices for single-step analysis using phenotypic, pedigree and genomic information. *Genet Sel Evol.* 2011;43:1.
26. Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Fernando RL, et al. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Front Genet.* 2014;5:134.
27. Lourenco D, Misztal I, Wang H, Aguilar I, Tsuruta S, et al. Prediction accuracy for a simulated maternally affected trait of beef cattle using different genomic evaluation models. *J Anim Sci.* 2013;91:4090-98.
28. Delta G Connection. Institutional. 2007. http://www.deltag.com.br/pt_br/pg_institucional.php. Accessed 10 Feb 2015.
29. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2013.
30. Clayton D. snpStats: SnpMatrix and XSnpmatrix classes and methods. R package version 1.18.0. 2014.

31. Sargolzaei M, Chesnais JP, Schenkel FS. FImpute – An efficient imputation algorithm for dairy cattle populations. *J Anim Sci.* 2011;89:333.
32. Misztal I, Tsuruta S, Strabel T, Auvray B, Druet T, et al. BLUPF90 and related programs (BGF90) In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 7., 2002, Montpellier. Proceedings... France. CD-ROM. Communication n.28-07, 2002.
33. VanRaden PM, Van Tassell CP, Wiggans GR, Sonstegard TS, Schnabel RD, et al. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J Dairy Sci.* 2009;92:16-24.
34. Strandén I, Garrick DJ. Technical note: Derivation of equivalent computing algorithms for genomic predictions and reliabilities of animal merit. *J Dairy Sci.* 2009;92:2971-75.
35. Zhang Z, Liu J, Ding X, Bijma P, de Koning DJ, et al. Best linear unbiased prediction of genomic breeding values using a trait-specific marker derived relationship matrix. *PLoS ONE.* 2010;5:e12648.
36. Sollero BP, Oliveira KSV, Santiago GG, Cardoso FF. Seleção de Marcadores a partir do Estudo de Associação Genômica Ampla para Resistência ao Carrapato em Bovinos das Raças Hereford e Braford. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 11., 2015, Santa Maria. Anais... Santa Maria, RS, Brasil, 2015.
37. Hu Z-L, Park CA, Wu X-L, Reecy JM. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D871-D879.
38. Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, et al. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 2009;10:4.
39. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.

40. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-29.
41. McClure MC, Ramey HR, Rolf MM, McKay SD, Decker JE, et al. Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner-Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. *Anim Genet.* 2012;43(6):662-73.
42. Sodeland M, Kent MP, Olsen HG, Opsal MA, Svendsen M, et al. Quantitative trait loci for clinical mastitis on chromosomes 2, 6, 14 and 20 in Norwegian Red cattle. *Anim Genet.* 2011;42(5):457-465.
43. Cesar AS, Regitano LCA, Mourão GB, Tullio RR, Lanna DP, et al. Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nelore cattle. *BMC Genet.* 2014;15:39.
44. Kizilkaya K, Tait RG, Garrick DJ, Fernando RL, Reecy JM. Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. *BMC Genet.* 2013;14:23.
45. Höglund JK, Guldbbrandsen B, Lund MS, Sahana G. Analyzes of genome-wide association follow-up study for calving traits in dairy cattle. *BMC Genet.* 2012;13:71.
46. Saatchi M, Schnabel RB, Taylor JF, Garrick DJ. Large-effect pleiotropic or closely linked QTL segregate within and across ten US cattle breeds. *BMC Genom.* 2014;15:442.
47. Howard JT, Kachman SD, Snelling WM, Pollak EJ, Ciobanu DC, et al. Beef cattle body temperature during climatic stress: a genome-wide association study. *Int J Biometeorol.* 2014;58(7):1665-72.
48. Baeza MC, Corva PM, Soria LA, Rincon G, Medrano JF, et al. Genetic markers of body composition and carcass quality in grazing Brangus steers. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):3146-56.

49. Huson HJ, Kim ES, Godfrey RW, Olson TA, McClure MC, et al. Genome-wide association study and ancestral origins of the slick- hair coat in tropically adapted cattle. *Front Genet.* 2014;5:101.
50. Sahana G, Guldbbrandtsen B, Lund MS. Genome-wide association study for calving traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 2011;94(1):479-86.
51. Sun X, Fernando RL, Garrick DJ, Dekkers JCM. An iterative approach for efficient calculation of Breed values and genome-wide association analysis using weighted genomic BLUP. *J Anim Sci.* 2011;89:E-Suppl 2.
52. Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Revs Genet.* 2004;5:89-100.
53. Villumsen TM, Janss L, Lund MS. The importance of haplotype length and heritability using genomic selection in dairy cattle. *J Anim Breed Genet.* 2009;126:3-13.
54. Sun X, Qu L, Garrick DJ, Dekkers JC, Fernando RL. A fast EM algorithm for BayesA-like prediction of genomic breeding values. *PLoS ONE.* 2012;7:e49157.
55. Zhang H, Wang Z, Wang S, Li H. Progress of genome-wide association study in domestic animals. *J Anim Sci Biotechnol.* 2012;3:26.
56. Daetwyler HD, Pong-Wong R, Villanueva B, Woolliams J.A. The impact of genetic architecture on genome-wide evaluation methods. *Genetics.* 2010;185(3):1021-31.
57. Habier D, Fernando RL, Dekkers JCM. The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. *Genetics.* 2007;177:2389-97.
58. Hayes BJ, Visscher PM, Goddard ME. Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genet Res.* 2009;91(1):47-60.

59. Tiezzi F, Maltecca C. Accounting for trait architecture in genomic predictions of US Holstein cattle using a weighted realized relationship matrix. *Genet Sel Evol.* 2015;47(1):24.
60. Gianola D, de los Campos G, Hill WG, Manfredi E, Fernando RL. Additive genetic variability and the Bayesian alphabet. *Genetics.* 2009;183:347-63.
61. van Hulzen KJ, Schopen GC, van Arendonk JA, Nielen M, Koets AP, et al. Genome-wide association study to identify chromosomal regions associated with antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch Holstein-Friesians. *J Dairy Sci.* 2012;95:2740-48.
62. Blasco A. The Bayesian controversy in animal breeding. *J Anim Sci.* 2001;79:2023-46.
63. Gasparin G, Miyata M, Coutinho LL, Martinez ML, Teodoro RL, et al. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Anim Genet.* 2007;38:453-59.
64. Regitano LCA, Ibelli AMG, Gasparin G, Miyata M, Azevedo ALS, et al. On the search for markers of tick resistance in bovines. *Dev Biol.* 2008;132:225-30.
65. Porto Neto LR, Bunch RJ, Harrison BE, Prayaga KC, Barendse W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. *BMC Genet.* 2010a;11:55.
66. Porto Neto LR, Jonsson NN, D'Occhio MJ, Barendse, W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. *Vet Parasitol.* 2011;180:165-72.
67. Barendse W. Assessing tick resistance in a bovine animal for selecting cattle for tick resistance by providing a nucleic acid from the bovine animal and assaying for the

occurrence of a single nucleotide polymorphism (SNP). Patent application WO2007051248-A1.:1-146. 2007.

68. Turner LB, Harrison BE, Bunch RJ, Porto Neto LR, Li Y, et al. A genome-wide association study of tick burden and milk composition in cattle. *Anim Prod Sci.* 2010;50:235-45.

69. Porto Neto LR, Piper EK, Jonsson NN, Barendse W, Gondro C. Meta-analysis of genome-wide association and gene expression studies to identify candidate genes for tick burden in cattle. In: *World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, 9., 2010b, Leipzig. Proceedings... Germany, 2010b. p.664.*

70. Piper EK, Jackson LA, Bagnall NH, Kongsuwan KK, Lew AE, et al. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;126:110-19.

71. Turni C, Lee RP, Jackson LA. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunol.* 2002;24:355-61.

72. Veríssimo CJ, Nicolau CVJ, Cardoso VL, Pinheiro MG. Haircoat characteristics and tick infestation on Gyr (Zebu) and crossbreed (Holstein x Gyr) cattle. *Arch Zootec.* 2002;51:389-92.

73. Marufu MC, Dzama K, Chimonyo M. Cellular responses to *Rhipicephalus microplus* infestations in pre-sensitized cattle with differing phenotypes of infestation. *Exp Appl Acarol.* 2014;62:241-52.

74. Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proenca L, et al. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol.* 2005;110:12-21.

75. Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen P, et al. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16:1074-86.
76. Carvalho WA, Lanella P, Arnoldi FGC, Caetano AR, Maruyama SR, et al. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. *Immunogenet*. 2011;63:319-24.
77. Macêdo AA, Marciano APV, Rocha LM, Alves Junior JRF, Faria AMC, et al. Comparative phenotypic profile of subpopulations of peripheral blood leukocytes in European (*Bos taurus taurus*) and Zebu cattle (*Bos taurus indicus*). *Genet Mol Res*. 2013;12:6838-49.

7 Considerações Finais

O desenvolvimento de tecnologias moleculares que permitem acessar e coletar informações diretamente do genoma dos animais, fornecendo assim uma fonte de informação adicional para incorporação em avaliações genéticas, representa uma promissora oportunidade para otimizar os progressos genéticos obtidos em programas de melhoramento animal. Ainda que os atuais custos de genotipagem não permitam sua aplicação em larga escala nos rebanhos, diversos trabalhos conduzidos no Brasil e no mundo têm se empenhado em apresentar alternativas que tornem mais acessível a implementação de estudos de associação genômica ampla (GWAS) e de seleção genômica.

Resultados de pesquisas com dados reais e simulados têm revelado o grande potencial da genômica para aumentar a eficiência de programas de melhoramento, sendo apontados ganhos em termos de aumento de acurácias de estimativas de parâmetros genéticos e possibilidade de diminuir o intervalo entre gerações, o que impacta diretamente em maiores ganhos genéticos obtidos em processos de seleção. À medida que estas novas tecnologias se tornam mais acessíveis financeiramente com a redução progressiva dos custos de genotipagem, as metodologias estatísticas utilizadas para estimação de efeitos dos marcadores também devem se adaptar, para comportar o aumento exponencial de dados gerados.

A tecnologia dos marcadores moleculares tem sem mostrado útil também para a caracterização da variabilidade genética de indivíduos e/ou populações e para melhor compreensão das bases biológicas envolvidas na expressão das características de interesse. Os estudos de diversidade genética são tradicionalmente baseados em informações de genealogia, e a genômica surge como estratégia para facilitar a manutenção da variabilidade genética nos rebanhos, possibilitando um melhor gerenciamento e controle sobre os níveis de endogamia, e para fornecer maior conhecimento sobre as reais semelhanças genéticas entre indivíduos.

A integração das tecnologias genômicas nas abordagens clássicas de genética quantitativa aplicadas no melhoramento representa uma verdadeira revolução na capacidade de predição do mérito genético dos indivíduos e nas possibilidades de maximizar os progressos genéticos obtidos pelos programas de melhoramento animal. É importante que, à medida que as novas tecnologias se tornem mais acessíveis, os produtores se familiarizem com os conceitos relacionados ao uso da genômica, e que compreendam quais os possíveis impactos de sua aplicação no seu sistema de produção, lembrando que o sucesso do melhoramento genético como estratégia de diferenciação deve estar sintonizado com as demandas do mercado consumidor. O pleno entendimento sobre como as ferramentas disponíveis atuam permite o correto uso destas, e facilita a identificação de possibilidades de otimização na aplicação das estratégias genômicas, com vistas a garantir um bom retorno financeiro sobre o investimento.

Os progressos observados na área da biologia molecular acompanham o crescente interesse de pesquisadores em investigar e desenvolver novas tecnologias capazes de auxiliar o produtor no processo de controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A elucidação dos genes envolvidos na expressão da resistência de bovinos ao carrapato constitui um grande desafio, devido à complexidade de sua natureza. O entendimento da arquitetura genética desta característica (quantos e quais genes afetam sua expressão, e como estes genes se relacionam neste processo) pode contribuir para a descoberta de marcadores moleculares associados à resistência, que possibilitarão a seleção mais acurada de indivíduos resistentes. Além disso, resultados gerados em termos de genes relacionados à resistência podem ser úteis também para pesquisas que investigam outros métodos de controle dos carrapatos, como o desenvolvimento de antígenos para produção de vacinas mais eficientes. O aumento da resistência genética de bovinos assistido pelas tecnologias genômicas e o aprimoramento dos métodos imunológicos de controle do carrapato perfazem a combinação mais promissora para minimizar a dependência aos tratamentos químicos e os demais prejuízos ocasionados pelo parasitismo nos rebanhos.

Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 11 mai. 2015.

ACOSTA-RODRÍGUEZ, R.; ALONSO-MORALES, R.; BALLADARES, S.; FLORES-AGUILAR, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GORODEZKY, C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.313-321, 2005.

AGUILAR, I.; MISZTAL, I.; JOHNSON, D.L.; LEGARRA, A.; TSURUTA, S.; LAWLOR, T.J. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.2, p.743-752, 2010.

AHSAN, M.; LI, X.; LUNDBERG, A.E.; KIERCZAK, M.; SIEGEL, P.B.; CARLBORG, O.; MARKLUND, S. Identification of candidate genes and mutations in QTL regions for chicken growth using bioinformatics analysis of NGS and SNP-chip data. **Frontiers in Genetics**, v.4, p.226, 2013.

AMARAL, A.J.; MEGENS, H.J.; CROOIJMANS, R.P.; HEUVEN, H.C.; GROENEN, M.A. Linkage disequilibrium decay and haplotype block structure in the pig. **Genetics**, v.179, p.569-579, 2008.

ANDREESCU, C.; AVENDANO, S.; BROWN, S.R.; HASSEN, A.; LAMONT, S.J.; DEKKERS, J.C. Linkage disequilibrium in related breeding lines of chickens. **Genetics**, v.177, p.2161-2169, 2007.

ANDREOTTI, R.; SOARES, M.A.; BARROS, J.C.; ROBERT, J.M.; PÉREZ DE LEÓN, A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.127-133, 2011.

ARDLIE, K.G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.299-309, 2002.

AVENDAÑO, S.; WOOLLIAMS, J.A.; VILLANUEVA B. Prediction of accuracy of estimated Mendelian sampling terms. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.122, n.5, p.302-308, 2005.

AYRES, D.R.; BALDI, F.; DIAZ, I.D.P.S.; ALBUQUERQUE, L.G.; ROSO, V.M. Estimativas de parâmetros genéticos para números de carrapatos (*Boophilus microplus*) em bovinos da raça Braford, utilizando o método da máxima verossimilhança restrita e inferência Bayesiana. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., Maringá, 2009. **Anais...** Maringá, PR, 2009.

AYRES, D.R.; PEREIRA, R.J.; BOLIGON, A.A.; BALDI, F.; ROSO, V.M.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and investigation of genotype x environment interactions in Nellore x Hereford crossbred for resistance to cattle ticks in different regions of Brazil. **Journal of Applied Genetics**, v.56, n.1, 2015.

BADKE, Y.M.; BATES, R.O.; ERNST, C.W.; SCHWAB, C.; FIX, J.; VAN TASSELL, C.P.; STEIBEL, J.P. Methods of tagSNP selection and other variables affecting imputation accuracy in swine. **BMC Genetics**, v.14, p.8, 2013.

BADKE, Y.M.; BATES, R.O.; ERNST, C.W.; SCHWAB, C.; STEIBEL, J.P. Estimation of linkage disequilibrium in four US pig breeds. **BMC Genomics**, v.13, p.24, 2012.

BARENDSE, W. **Assessing tick resistance in a bovine animal for selecting cattle for tick resistance by providing a nucleic acid from the bovine animal and assaying for the occurrence of a single nucleotide polymorphism (SNP)**. Número de patente: WO2007051248-A1, 2007.

BARRIGA, O.O.; SILVA, S.S.; AZEVEDO, J.S.C. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. **Journal of Parasitology**, v.79, p.710-715, 1993.

BIANCHINI, E.; MCMANUS, C.; LUCCI, C.M.; FERNANDES, M.C.B.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.9, p.1443-1448, 2006.

BIEGELMEYER, P. **Resistência genética à infestação natural e artificial por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos das raças Hereford e Braford**. 2012. 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L.Q.; DA SILVA, S.S.; DOS SANTOS, T.R.B.; DIONELLO N.J.L.; GULIAS-GOMES, C.C.; CARDOSO, F.F. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.208, n.3-4, p. 231-237, 2015.

BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; SUNDEN, S.L.F.; HAWKINS, G.A.; TOLDO, S.S.; FRIES, R.; GROSZ, M.D.; YOO, Y.; BEATTIE, C.W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v.136, p.619-639, 1994.

BOICHARD, D.; CHUNG, H.; DASSONNEVILLE, R.; DAVID, X.; EGGEN, A.; FRITZ, S.; GIETZEN, K.J.; HAYES, B.J.; LAWLEY, C.T.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; VANRADEN, P.M.; VIAUD-MARTINEZ, K.A.; WIGGANS, G.R. Design of a Bovine Low-Density SNP Array Optimized for Imputation. **PLoS ONE**, v.7, n.3, e34130, 2012.

BOISON, S.A.; SANTOS, D.J.; UTSUNOMIYA, A.H.; CARVALHEIRO, R.; NEVES, H.H.; O'BRIEN, A.M.; GARCIA, J.F.; SÖLKNER, J.; DA SILVA, M.V. Strategies for single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping to enhance genotype imputation in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle: Comparison of commercially available SNP chips. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.7, p.4969-4989, 2015.

BORÉM, A. Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. 2ed. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2009. p.95-102.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, v.243, n.2, p.177-186, 1999.

BROWNING, S.R.; BROWNING, B.L. Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. **American Journal of Human Genetics**, v.81, p.1084-1097, 2007.

BRØNDUM, R.; GULDBRANDTSEN, B.; SAHANA, G.; LUND, M.; SU, G. Strategies for imputation to whole genome sequence using a single or multi-breed reference population in cattle. **BMC Genomics**, v.15, n.1, p.728, 2014.

BUDELI, M.A.; NEPHAWA, K.A.; NORRIS, D.; SELAPA, N.W.; BERGH, L.; MAIWASHE, A. Genetic parameter estimates for tick resistance in Bonsmara cattle. **South African Journal of Animal Science**, v.39, p.321-327, 2009.

BURROW, H.M. Variances and covariances between productive and adaptive traits and temperament in a composite breed of tropical beef cattle. **Livestock Production Science**, v.70, p.213-233, 2001.

CARDOSO, F.F. Melhoramento genético de bovinos de corte. In: BARCELOS, J. et al. **Caderno de atualização técnica de julgamento de Hereford e Braford**. 2007. p.114-121.

CARDOSO, F.F.; LOPA, T.B.P.; BIEGELMEYER, P.; ARAÚJO, R.O.; CAETANO, A.R. Avanços nos programas de avaliação genética aplicados à pecuária de corte. In: JORNADA NESPRO - NÚCLEO DE ESTUDOS EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E CADEIA PRODUTIVA, 8., Porto Alegre, RS, 2013. (Palestra)

CARLSON, C.S.; EBERLE, M.A.; KRUGLYAK, L.; NICKERSON, D.A. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. **Nature**, v.429, 446-452, 2004a.

CARLSON, C.S.; EBERLE, M.A.; RIEDER, M.J.; YI, Q.; KRUGLYAK, L.; NICKERSON, D.A. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. **American Journal of Human Genetics**, v.74, n.1, p.106-120, 2004b.

CARVALHEIRO, R.; BOISON, S.A.; NEVES, H.H.R.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F.S.; UTSUNOMIYA, Y.T.; O'BRIEN, A.M.P.; SÖLKNER, J.; MCEWAN, J.C.; VAN TASSELL, C.P.; SONSTEGARD, T.S.; GARCIA, J.F. Accuracy of genotype imputation in Nelore cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.46, p.69, 2014.

CHEN, C.Y.; MISZTAL, I.; AGUILAR, I.; LEGARRA, A.; MUIR, W.M. Effect of different genomic relationship matrices on accuracy and scale. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2673-2679, 2011.

CHRISTENSEN, O.F.; LUND, M.S. Genomic prediction when some animals are not genotyped. **Genetics Selection Evolution**, v.42, n.2, p.1-8, 2010.

CHRISTENSEN, O.F.; MADSEN, P.; NIELSEN, B.; OSTERSEN, T.; SU, G. Single-step methods for genomic evaluation in pigs. **Animal**, v.6, n.10, p.1565-1571, 2012.

COLE, J.B.; WIGGANS, G.R.; MA, L.; SONSTEGARD, T.S.; LAWLOR, T.J.; CROOKER, B.A.; VAN TASSELL, C.P.; YANG, J.; WANG, S.; MATUKUMALLI, L.K.; DA, Y. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. **BMC Genomics**, v.12, p.408-465, 2011.

COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetics variation. **Genome Research**, v.8, p.1229-31, 1998.

CONEXÃO DELTA G. **Institucional**. 2007. Disponível em: <http://www.deltag.com.br/pt_br/pg_institucional.php> Acesso em 10 Fev. 2015.

CONRAD, D.F.; JAKOBSSON, M.; COOP, G.; WEN, X.; WALL, J.D.; ROSENBERG, N.A.; PRITCHARD, J.K. A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Genetics**, v.38, p.1251-1260, 2006.

CORBIN, L.J.; KRANIS, A.; BLOTT, S.C.; SWINBURNE, J.E.; VAUDIN, M.; BISHOP, S.C.; WOOLLIAMS, J. The utility of low-density genotyping for imputation in the Thoroughbred horse. **Genetics Selection Evolution**, v.46, p.9. 2014.

CORDELL, H.J.; CLAYTON, D.G. Genetic association studies. **The Lancet**, v.366, n.9491, p.1121-1131, 2005.

COSTA, R.B.; CAMARGO, G.M.F.; DIAZ, I.D.P.S.; IRANO, N.; DIAS, M.M.; CARVALHEIRO, R.; BOLIGON, A.A.; BALDI, F.; OLIVEIRA, H.N.; TONHATI, H.; ALBUQUERQUE, L.G. Genome-wide association study of reproductive traits in Nellore heifers using Bayesian inference. **Genetics Selection Evolution**, v.47, p.67, 2015.

COUTINHO, L.; ROSARIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, 2010.

CRUZ, B.C.; LOPES, W.D.; MACIEL, W.G.; FELIPPELLI, G.; FÁVERO, F.C.; TEIXEIRA, W.F.; CARVALHO, R.S.; RUIVO, M.A.; COLLI, M.H.; SAKAMOTO, C.A.; DA COSTA, A.J.; OLIVEIRA, G.P. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.207, p.309-317, 2015.

DAETWYLER, H.D.; VILLANUEVA, B.; WOOLLIAMS, J.A. Accuracy of predicting the genetic risk of disease using a genome-wide approach. **PLoS ONE**, v.3, n.10, e3395, 2008.

DE ROOS, A.P.; 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.

DECKER, J.E.; DANIEL, A.V.; MCKAY, S.D.; MCCLURE, M.C.; ROLF, M.M.; KIM, J.; NORTHCUTT, S.L.; BAUCK, S.; WOODWARD, B.W.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F. A novel analytical method, Birth Date Selection Mapping, detects response of the Angus (*Bos taurus*) genome to selection on complex traits. **BMC Genomics**, v.13, p.606, 2012.

DEKKERS, J.C.M; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.22-32, 2002.

DODDS, K.G.; TATE, M.L.; SISE, J.A. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. **Journal of Animal Science**, v.83, p.2271-2279, 2005.

DRUET, T.; GEORGES, M. A hidden Markov model combining linkage and linkage disequilibrium information for haplotype reconstruction and quantitative trait locus fine mapping. **Genetics**, v.184, p.789-798, 2010.

ESPIGOLAN, R.; BALDI, F.; BOLIGON, A.A.; SOUZA, F.R.P.; GORDO, D.G.M.; TONUSSI, R.L.; CARDOSO, D.F.; OLIVEIRA, H.N.; TONHATI, H.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F.S.; CARVALHEIRO, R.; FERRO, J.A.; ALBUQUERQUE, L.G. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC Genomics**, v.14, p.305, 2013.

EUCLIDES FILHO, K. **O melhoramento genético e os cruzamentos em bovino de corte**. Campo Grande, MS: Embrapa, Documentos 63, 1997. 35p.

EUCLIDES FILHO, K. Evolução do melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. **Revista Ceres**, v.56, n.5, p.620-626, 2009.

EUCLIDES FILHO, K. Cenários para a cadeia produtiva da carne bovina no Brasil. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.1-10.

EUCLIDES FILHO, K. **Melhoramento genético animal no Brasil: fundamentos, história e importância**. Campo Grande, MS: Embrapa, Documentos 75, 1999. 63p.

FALCONER, D.S.; MACKEY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. London: Longman, 1996. 464p.

FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; REZENDE, F.M. Seleção genômica aplicada ao melhoramento animal: desafios atuais e expectativas futuras do criador. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 9., João Pessoa, PB, 2012. (Palestra)

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3ed. Brasília, DF: Embrapa, 1998. 220p.

FLURY, C.; TAPIO, M.; SONSTEGARD, T.; DROGEMULLER, C.; LEEB, T.; SIMIANER, H.; HANOTTE, O.; RIEDER, S. Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.127, p.339-347, 2010.

FORNI, S.; AGUILAR, I.; MISZTAL, I. Different genomic relationship matrices for single-step analysis using phenotypic, pedigree and genomic information. **Genetics Selection Evolution**, v.43, n.1, p.1-7, 2011.

FRAGA, A.B.; ALENCAR, M.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; CYRILLO, J. N.S.G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, supl.1, p.1578-1586, 2003.

FREEMAN, A.R.; HOGGART, C.J.; HANOTTE, O.; BRADLEY, D.G. Assessing the relative ages of admixture in the bovine hybrid zones of Africa and the Near East using X chromosome haplotype mosaicism. **Genetics**, v.173, p.1503-1510, 2006.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.57-71, 1999.

FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J.; KELLY, M.J. Using genetics to control cattle parasites - the Rockhampton experience. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.253-264, 2000.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. **Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras.** Juiz de Fora, MG: Embrapa, Comunicado Técnico 36, 2003. 6p.

GAO, H.; CHRISTENSEN, O.F.; MADSEN, P.; NIELSEN, U.S.; ZHANG, Y.; LUND, M.S.; SU, G. Comparison on genomic predictions using three GBLUP methods and two single-step blending methods in the Nordic Holstein population. **Genetics Selection Evolution**, v.44, p.8, 2012.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L.L.; MARTINEZ, M.L.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; SONSTEGARD, T.S.; REGITANO, L.C.A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v.38, p.453-459, 2007.

GAUTIER, M., FARAUT, T., MOAZAMI-GOUDARZI, K., NAVRATIL, V., FOGGIO, M., GROHS, C., BOLAND, A., GARNIER, J.G., BOICHARD, D., LATHROP, G.M., GUT, I.G., EGGEN, A. Genetic and haplotypic structure in 14 European and African cattle breeds. **Genetics**, v.177, p.1059-1070, 2007.

GIANOLA, D.; DE LOS CAMPOS, G. Inferring genetic values for quantitative traits non-parametrically. **Genetical Research**, v.90, n.1, p.525-540, 2009.

GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. Genomic selection. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, n.6, p.323-330, 2007.

GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programs. **Nature Reviews Genetics**, v.10, n.6, p.381-391, 2009.

GOLDSTEIN, D.B. Islands of linkage disequilibrium. **Nature Genetics**, v.29, p.109-111, 2001.

GONÇALVES, F.M.; PIRES, A.V.; PEREIRA, I.G.; GARCIA, D.A.; FARAH, M.M.; MEIRA, C.T.; CRUZ, V.A.R. Avaliação genética para peso corporal em um rebanho Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.158-164, 2011.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; CANÇADO, P.H.D.; LÉON, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILELA, H.S. Reassessment of the potential

economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p.150-156, 2014.

GROBET, L.; MARTIN, L.J.R.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v.17, p.71-74, 1997.

HABIER, D.; FERNANDO, R.L.; KIZILKAYA, K.; GARRICK, D.J. Extension of the Bayesian alphabet for genomic selection. **BMC Bioinformatics**, v.12, n.1, p.1-12, 2011.

HABIER, D.; TETENS, J.; SEEFRIED, F.R.; LICHTNER, P.; THALLER, G. The impact of genetic relationship information on genomic breeding values in German Holstein cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.19, n.2, p.42-45, 2010.

HAYES, B.J.; BOWMAN, P.J.; CHAMBERLAIN, A.J.; GODDARD, M.E. Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.1, p.433-443, 2009.

HAYES, B.J.; BOWMAN, P.J.; DAETWYLER, H.D.; KIJAS, J.W.; VAN DER WERF, J.H.J. Accuracy of genotype imputation in sheep breeds. **Animal Genetics**, v.43, p.72-80, 2012.

HEIDARITABAR, M.; CALUS, M.P.L.; VEREIJKEN, A.; GROENEN, M.A.M.; BASTIAANSEN, J.W.M. Accuracy of imputation using the most common sires as reference population in layer chickens. **BMC Genetics**, v.16, p.101, 2015.

HENDERSON, C.R. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. **Biometrics**, v.31, p.423, 1975.

HENSHALL, J.M. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.55, p.1109-1116, 2004.

HICKEY, J.M.; KINGHORN, B.P.; TIER, B.; WILSON, J.F.; DUNSTAN, N.; VAN DER WERF, J.H.J. A combined long-range phasing and long haplotype imputation method to impute phase for SNP genotypes. **Genetics Selection Evolution**, v.43, p.12, 2011.

HILL, W.G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.38, n.1, p.226-231, 1968.

HOWIE, B.N.; DONNELLY, P.; MARCHINI, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. **PLoS Genetics**, v.5, n.6, e1000529, 2009.

HOZÉ, C.; FOUILLOUX, M.N.; VENOT, E.; GUILLAUME, F.; DASSONNEVILLE, R.; FRITZ, S.; DUCROCQ, V.; PHOCAS, F.; BOICHARD, D.; CROISEAU, P. High-density marker imputation accuracy in sixteen French cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v.45, p.33, 2013.

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.

HUANG, Y.; HICKEY, J.M.; CLEVELAND, M.A.; MALTECCA, C. Assessment of alternative genotyping strategies to maximize imputation accuracy at minimal cost. **Genetics Selection Evolution**, v.44, p.25, 2012.

HÜE, T.; HURLIN, J.C.; TEURLAI, M.; NAVES, M. Comparison of tick resistance of crossbred Senepol x Limousin to purebred Limousin cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, n.2, p.447-453, 2014.

HUTCHISON, J.L.; COLE, J.B.; BICKHART, D.M. Short communication: use of young bulls in the United States. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.3213-3220, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária**. Setembro de 2015.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v.129, S3-S14, 2004.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.1-10, 2006.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.1-9, 2008.

JONSSON, N.N.; PIPER, E.K. **Integrated control programs for ticks on cattle**. Queensland, Australia: UQ Printery, 2007. 163p.

JOSAHKIAN, L.A. Avaliação zootécnica e funcional em gado de corte. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus - Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.179-194.

KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; MCGRAW, R.A.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; BEATTIE, C.W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v.7, p.235-249, 1997.

KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L.; VALENTINI, A.; GEORGES, M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using multiplex oligonucleotide ligation assay. **Animal Genetics**, v.31, p.396-399, 2000.

KERR, R.J.; FRISCH, J.E.; KINGHORN, B.P. Evidence for a major gene for tick resistance in cattle. In: WORLD CONGRESS ON GENETIC APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph, Ontario. **Proceedings...** Guelph, p.265-268, 1994.

KHATKAR, M.S.; MOSER, G.; HAYES, B.J.; RAADSMA, H.W. Strategies and utility of imputed SNP genotypes for genomic analysis in dairy cattle. **BMC Genomics**, v.13, p.538, 2012.

KHATKAR, M.S., NICHOLAS, F.W., COLLINS, A.R., ZENGER, K.R., CAVANAGH, J.A., 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, 2008.

KIM, E.S.; SONSTEGARD, T.S.; DA SILVA, M.V.; GASBARRE, L.C.; VAN TASSELL, C.P. Genome-wide scan of gastrointestinal nematode resistance in closed Angus population selected for minimized influence of MHC. **PLoS ONE**, v.10, p.3, 2015.

LEEMON, D.M.; TURNER, L.B.; JONSSON, N.N. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium amisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**, v.156, p.248-260, 2008.

LEGARRA, A.; AGUILAR, I.; MISZTAL, I. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.9, p.4656-4663, 2009.

LEMONS, A.M.; TEODORO, R.L.; OLIVEIRA, G.P.; MADALENA, F.E. Comparative performance of six Holstein-friesian x Guzera grade in Brazil. Burdens of *Boophilus microplus* under field condition. **Animal Production**, v.41, p.187-191, 1985.

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

LI, N.; STEPHENS, M. Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. **Genetics**, v.165, p.2213-2233, 2003.

LI, R.; LI, Y.; FANG, X.; YANG, H.; WANG, J.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. **Genome Research**, v.19, p.1124-1132, 2009.

LI, Y.; WILLER, C.J.; DING, J.; SCHEET, P.; ABECASIS, G.R. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. **Genetic Epidemiology**, v.34, p.816-834, 2010.

LIPKIN, E.; STRAUS, K.; STEIN, R.T.; BAGNATO, A.; SCHIAVINI, F.; FONTANESI, L.; RUSSO, V.; MEDUGORAC, I.; FOERSTER, M.; SOLKNER, J.; DOLEZAL, M.; MEDRANO, J.F.; FRIEDMANN, A.; SOLLER, M. Extensive long-range and nonsyntenic linkage disequilibrium in livestock populations: deconstruction of a conundrum. **Genetics**, v.181, p.691-699, 2009.

MA, P.; BRØNDUM, R.F.; ZHANG, Q.; LUND, M.S.; SU, G. Comparison of different methods for imputing genome-wide marker genotypes in Swedish and Finnish Red Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.4666-4677, 2013.

MACEDO, L.O.B. Modernização da pecuária de corte bovina no Brasil e a importância do crédito rural. **Informações Econômicas**, v.36, n.7, 2006.

MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.S.; TEODORO, R.L.; PIRES, M.A.; PEIXOTO, M.G.C.D.; FREITAS, C.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, M.V.G.B.; GUIMARÃES, S.E.F.; REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R.S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v.11, p.1-11, 2010.

MACHADO, P.F.A.; AQUINO, L.H.; GONÇALVES, T.M. Estimativas de parâmetros genéticos e critérios de seleção em características ponderais de bovinos Nelore. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p.197-204, 1999.

MACNEIL, M.D.; NKRUMAH, J.D.; WOODWARD, B.W.; NORTH CUTT, S.L. Genetic evaluation of Angus cattle for carcass marbling using ultrasound and genomic indicators. **Journal of Animal Science**, v.88, n.2, p.517-522, 2010.

MARADAY, J.A.O.; GONZALES, J.C. Efeitos das raças Santa Gertrudis e Aberdeen Angus em infestações de *B. microplus* (Canestrini, 1887): I - Dimensões e peso das fêmeas ingurgitadas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. UFRGS, Porto Alegre, v.12, n.12, p.127-38, 1984.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; SILVA, M.V.G.B.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; CAMPOS, A.L.; GUIMARÃES, M.F.M.; AZEVEDO, A.L.S.; PIRES, M.F.A.; VERNEQUE, R.S. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.514-524, 2006.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **The Veterinary Record**, v.149, n.2, p.64, 2001.

MCEVOY, B.P.; POWELL, J.E.; GODDARD, M.E.; VISSCHER, P.M. Human population dispersal "Out of Africa" estimated from linkage disequilibrium and allele frequencies of SNPs. **Genome Research**, v.21, p.821-829, 2011.

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

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.94, p.12457-12461, 1997.

MEADOWS, J.R.; CHAN, E.K.; KIJAS, J.W. Linkage disequilibrium compared between five populations of domestic sheep. **BMC Genetics**, v.9, p.61, 2008.

MENEZES, G.R.O.; REGITANO, L.C.A.; SILVA, M.V.G.B.; CARDOSO, F.F.; SILVA, L.O.C.; SIQUEIRA, F.; EGITO, A.A. Genômica aplicada ao melhoramento genético de bovinos de corte. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.213-225.

MEUWISSEN, T.H.E. Accuracy of breeding values of 'unrelated' individuals predicted by dense SNP genotyping. **Genetics Selection Evolution**, v.41, n.1, p.1-9, 2009.

MEUWISSEN, T.H.E.; GODDARD, M.E. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. **Genetics Selection Evolution**, v.28, p.161-176, 1996.

MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v.157, n.4, p.1819-1829, 2001.

MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Accelerating improvement of livestock with genomic selection. **Annual Review of Animal Biosciences**, v.1, n.1, p.221-237, 2013.

MIRKENA, T.; DUGUMA, G.; HAILE, A.; TIBBO, M.; OKEYO, A.M.; WURZINGER, M.; SÖLKNER, J. Genetics of adaptation in domestic farm animals: a review. **Livestock Science**, v.132, p.1-12, 2010.

MISZTAL, I.; LEGARRA, A.; AGUILAR, I. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.9, p.4648-4655, 2009.

MUNOZ, P.R.; RESENDE JR., M.F.R.; HUBER, D.A.; QUESADA, T.; RESENDE, M.D.V.; NEALE, D.B.; WEGRZYN, J.L.; KIRST, M.; PETER, G.F. Genomic relationship matrix for correcting pedigree errors in breeding populations: impact on genetic parameters and genomic selection accuracy. **Genetics Selection Evolution**, v.47, p.9, 2015.

NICHOLAS, F.W. **Introdução à genética veterinária**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 344p.

NICOLAZZI, E.L.; BIFFANI, S.; BISCARINI, F.; OROZCO TER WENGEL, P.; CAPRERA, A.; NAZZICARI, N.; STELLA, A. Software solutions for the livestock genomics SNP array revolution. **Animal Genetics**, v.46, n.4, p.343-353, 2015.

NIETO, L.M.; ALENCAR, M.M.; ROSA, A.N. Critérios de seleção. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.109-122.

OBEREM, P.T. The immunological basis of host resistance to ticks: A review. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.55, n.4, p.215-217, 1984.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue holandês-guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.42, n.2, p.127-135, 1990.

O'NEILL, C.J.; SWAIN, D.L.; KADARMIDEEN, H.N. Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favourable versus unfavourable environments and its implications for genetic selection. **Evolutionary Applications**, v.3, p.422-433, 2010.

PASSAFARO, T.L.; CARRERA, J.P.B.; SANTOS, L.L.; RAIDAN, F.S.S.; SANTOS, D.C.C.; CARDOSO, E.P.; LEITE, R.C.; TORAL, F.L.B. Genetic analysis of resistance to ticks, gastrointestinal nematodes and *Eimeria* spp. in Nellore cattle. **Veterinary Parasitology**, v.210, p.224-234, 2015.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004. 609p.

PÉREZ O'BRIEN, A.M.; MÉSZÁROS, G.; UTSUNOMIYA, Y.T.; SONSTEGARD, T.S.; GARCIA, F.J.; VAN TASSELL, C.P.; CARVALHEIRO, R.; SILVA, M.V.B.; SÖLJNERM, J. Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using medium and high density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. **Livestock Science**, v.166, p.121-132, 2014.

PETERS, S.O.; KIZILKAYA, K.; GARRICK, D.J.; FERNANDO, R.L.; REECY, J.M.; WEABER, R.L.; SILVER, G.A.; THOMAS, M.G. Bayesian genome-wide association analysis of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. **Journal of Animal Science**, v.90, n.10, p.3398-33409, 2012.

PORTO NETO, L.R.; BUNCH, R.J.; HARRISON, B.E.; BARENDSE, W. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. **Animal Genetics**, v.42, n.1, p.50-55, 2011.

PORTO NETO, L.R.; BUNCH, R.J.; HARRISON, B.E.; PRAYAGA, K.C.; BARENDSE, W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. **BMC Genetics**, v.11, p.55, 2010.

PRAYAGA, K.C.; HENSHALL, J.M. Adaptability in tropical beef cattle: genetic parameters of growth, adaptive and temperament traits in a crossbred population. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.971-983, 2005.

QANBARI, S.; PIMENTEL, E.C.; TETENS, J.; THALLER, G.; LICHTNER, P.; SHARIFI, A.R.; SIMIANER, H. The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. **Animal Genetics**, v.41, p.346-356, 2010.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2013.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; SILVEIRA, J.; MARTINS, J.R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricide. **Veterinary Parasitology**, v.201, p.128-136, 2014a.

RECK, J.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, R.O.; SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEITE, R.C.; GONZALES, J.C.; KLAFKE, G.M.; MARTINS, J.R. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, n.1, p.59-62, 2014b.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia Molecular aplicada à produção animal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215p.

REGITANO, L.C.A.; IBELLI, A.M.G.; GASPARIN, G.; MIYATA, M.; AZEVEDO, A.L.S.; COUTINHO, L.L.; TEODORO, R.L.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B.; NAKATA, L.C.; ZAROS, L.G.; SONSTERGARD, T.S.; SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M. On the search for markers of tick resistance in bovines. **Developments in Biologicals**, v.132, p.225-230, 2008.

REICH, D.E.; CARGILL, M.; BOLK, S.; IRELAND, J.; SABETI, P.C.; RICHTER, D.J.; LAVERY, T.; KOUYOUJIAN, R.; FARHADIAN, S.F.; WARD, R.; LANDER, E.S. Linkage disequilibrium in the human genome. **Nature**, v.411, p.199-204, 2001.

RESENDE, M.D.V. **Selegen–Reml/Blup: Sistema Estatístico e Seleção Genética Computadorizada via Modelos Lineares Mistos**. Campo Grande, MS: Embrapa, 2007. 360p.

RESENDE, M.D.V.; LOPES, P.S.; SILVA, R.L.; PIRES, I.E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.1, n.56, p.63-77, 2008.

RESENDE, M.D.V.; RESENDE JR., M.F.R.; AGUIAR, A.M.; ABAD, J.I.M.; MISSIAGGIA, A.A.; SANSALONI, C.; PETROLI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Computação da Seleção Genômica Ampla (GWS)**. Colombo, PR: Embrapa, Documentos 210, 2010. 79p.

RODRÍGUEZ VALLE, M.; MÉNDEZ, L.; VALDEZ, M.; REDONDO, M.; ESPINOSA, C.M.; VARGAS, M.; CRUZ, R.L.; BARRIOS, H.P.; SEOANE, G.; RAMÍREZ, E.S.; BOUÉ, O.; VIGIL, J.L.; MACHADO, H.; NORDELO, C.B.; PIÑEIRO, M.J. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. **Experimental and Applied Acarology**, v.34, p.375-382, 2004.

ROSA, A.N.; MENEZES, G.R.O.; EGITO, A.A. Recursos genéticos e estratégias de melhoramento. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.11-26.

ROSHYARA, N.R.; SCHOLZ, M. Impact of genetic similarity on imputation accuracy. **BMC Genetics**, v.16, p.90, 2015.

SAATCHI, M.; SCHNABEL, R.D.; ROLF, M.M.; TAYLOR, J.F.; GARRICK, D.J. Accuracy of direct genomic breeding values for nationally evaluated traits in US Limousin and Simmental beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.44, p.38, 2012.

SAATCHI, M.; WARD, J.; GARRICK, D.J. Accuracies of direct genomic breeding values in Hereford beef cattle using national or international training populations. **Journal of Animal Science**, v.91, n.4, p.1538-1551, 2013.

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.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S.; NUTALL, P.A. **Ticks: Biology, Disease and Control**. New York: Cambridge University Press, 2008. p.447-469.

SANTOS JR., J.C.B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do grande Rio. **Ciência Rural**, v.30, p.305-311, 2000.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J.P.; SCHENKEL, F.S. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics**, v.15, p.478, 2014.

SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F.S.; JANSEN, G.B.; SCHAEFFER, L.R. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. **Journal of Dairy Science**, v.91, 2106-2117, 2008.

SCHAEFFER, L.R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.123, n.4, p.218-223, 2006.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1477-1482, 2010.

SIMM, G.; OLDHAM, J.D.; COFFEY, M.P.; PRYCE, J.E.; KADARMIDEEN, H.N. Future dairy cattle breeding strategies. **Cattle Practice**, v.8, p.391-400, 2000.

SOLBERG, T.R.; SONESSON, A.K.; WOOLLIAMS, J.A.; MEUWISSEN, T.H.E. Genomic selection using different marker types and densities. **Journal of Animal Science**, v.86, n.10, p.2447-2454, 2008.

SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSEL, C.P. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genetics Research**, v.84, n.1, p.3-9., 2004.

SUTHERST, R.W.; UTECH, K.B.W. Controlling livestock parasites with host resistance. In: PIMENTEL, D. (Ed.). **CRC Handbook of Pest Management in Agriculture** - v.2, Florida: CRC Press Inc., 1981. p.385-407.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.2005-2233, 1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.6463-6471, 1989.

TENESA, A.; NAVARRO, P.; HAYES, B.J.; DUFFY, D.L.; CLARKE, G.M.; GODDARD, M.E.; VISSCHER, P.M. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. **Genome Research**, v.17, p.520-526, 2007.

TEO, Y.Y.; SMALL, K.S.; FRY, A.E.; WU, Y.; KWIATKOWSKI, D.P.; CLARK, T.G. Power consequences of linkage disequilibrium variation between populations. **Genetic Epidemiology**, v.33, p.128-135, 2009.

TERWILLIGER, J.D.; ZOLLNER, S.; LAAN, M.; PAABO, S. Mapping genes through the use of linkage disequilibrium generated by genetic drift: 'drift mapping' in small populations with no demographic expansion. **Human Heredity**, v.48, p.138-154, 1998.

THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM. Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. **Science**, v.324, n.5926, p.528-532, 2009.

THEVENON, S.; DAYO, G.K.; SYLLA, S.; SIDIBE, I.; BERTHIER, D.; LEGROS, H.; BOICHARD, D.; EGGEN, A.; GAUTIER, M. The extent of linkage disequilibrium in a large cattle population of western Africa and its consequences for association studies. **Animal Genetics**, v.38, p.277-286, 2007.

TIBSHIRANI, R. Regression shrinkage and selection via the Lasso. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, v.58, n.1, p.267-288, 1996.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.

TIZIKARA, C.; AKINOKUN, O.; CHIBOKA, O. A review of factors limiting productivity and evolutionary adaptation of tropical livestock. **World Review of Animal Production**, v.21, n.4, p.41-46, 1985.

TIZIOTO, P.C.; DECKER, J.E.; TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; MUDADU, M.A.; SILVA, F.L.; MOURÃO, G.B.; COUTINHO, L.L.; THOLON, P.; SONSTEGARD, T.S.;

ROSA, A.N.; ALENCAR, M.M.; TULLIO, R.R.; MEDEIROS, S.R.; NASSU, R.T.; FEIJÓ, G.L.; SILVA, L.O.; TORRES, R.A.; SIQUEIRA, F.; HIGA, R.H.; REGITANO, L.C. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v.45, n.21, p.1012-1020, 2013.

TORRES JR., R.A.A.; SILVA, L.O.C.; MENEZES, G.R.O.; NOBRE, P.R.C. Melhoramento animal na era das DEP's. In: ROSA, A.N. et al. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus - Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.149-166.

TURNER, J.W. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, v.50, p.1201-1205, 1980.

TURNER, L.B.; HARRISON, B.E.; BUNCH, R.J.; PORTO NETO, L.R.; LI, Y.; BARENDSE, W. A genome-wide association study of tick burden and milk composition in cattle. **Animal Production Science**, v.50, p.235-245, 2010.

UEMOTO, Y.; SASAKI, S.; SUGIMOTO, Y.; WATANABE, T. Accuracy of high-density genotype imputation in Japanese Black cattle. **Animal Genetics**, v.46, p.388-394, 2015.

UIMARI, P.; TAPIO, M. Extent of linkage disequilibrium and effective population size in Finnish Landrace and Finnish Yorkshire pig breeds. **Journal of Animal Science**, v.89, p.609-614, 2011.

UNTALAN, P.M.; PRUETT, J.H.; STEELMAN, C.D. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.190-195, 2007.

VAN DEN BERG, I.; FRITZ, S.; BOICHARD, D. QTL fine mapping with Bayes C(π): a simulation study. **Genetics Selection Evolution**, v.45, p.19, 2013.

VAN TASSEL, C.P. The use of SNP chips for selection of dairy cattle. In: APPLIED GENOMICS FOR SUSTAINABLE LIVESTOCK BREEDING MEETING, 1., 2011, Melborn. **Proceedings...** Melborn: 2011. (CD-ROM).

VANRADEN, P.M.; O'CONNELL, J.R.; WIGGANS, G.R.; WEIGEL, K.A. Genomic evaluations with many more genotypes. **Genetics Selection Evolution**, v.43, p.10, 2011.

VANRADEN, P.M.; VAN TASSELL, C.P.; WIGGANS, G.R.; SONSTEGARD, T.S.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; SCHENKEL, F.S. Invited review: reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.1, p.16-24, 2009.

VILLARES, J.B. Climatologia zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, v.4, n.1, p.60-86, 1941.

WAMBURA, P.N.; GWAKISA, O.S.; SILAYO, R.S.; RUGAIMUKAMU, E.A. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.63-70, 1998.

WANG, H.; MISZTAL, I.; AGUILAR, I.; LEGARRA, A.; FERNANDO, R.L.; VITEZICA, Z.; OKIMOTO, R.; WING, T.; HAWKEN, R.; MUIR, W.M. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. **Frontiers in Genetics**, v.5, n.134, 2014.

WANG, H.; MISZTAL, I.; AGUILAR, I.; LEGARRA, A.; MUIR, W. M. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. **Genetics Research**, v.94, n.2 p.73-83, 2012.

WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U.A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G.M.; WALTER O. BEYS-DA-SILVAA; MARTINS, J.R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.207, p.302-308, 2015.

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Australian Journal of Entomology**, v.9, n.3, p.171-182, 1970.

WHITTAKER, J.C.; THOMPSON, R.; DENHAM, M.C. Marker-assisted selection using ridge regression. **Genetics Research**, v.75, n.4, p.249-252, 2000.

WIENTJES, Y.C.J.; VEERKAMP, R.F.; CALUS, M.P.L. The effect of linkage disequilibrium and family relationships on the reliability of genomic prediction. **Genetics**, v.193, p.621-631, 2013.

WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.1-22, 1996.

WILKINSON, P.R. Observations on infestation of undipped cattle of British breeds with the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.6, p.655-665, 1955.

WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.161-168, 2006.

XIANG, T.; MA, P.; OSTERSEN, T.; LEGARRA, A.; CHRISTENSEN, O.F. Imputation of genotypes in Danish purebred and two-way crossbred pigs using low-density panels. **Genetics Selection Evolution**, v.47, p.54, 2015.

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; FANG, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, p.2, 2013.

ZHANG, C.; WANG, Z.; BRUCE, H.; KEMP, R.A.; CHARAGU, P.; MIAR, Y.; YANG, T.; PLASTOW, G. Genome-wide association studies (GWAS) identify a QTL close to PRKAG3 affecting meat pH and colour in crossbred commercial pigs. **BMC Genetics**, v.16, p.33, 2015.

ZHANG, Z.; DRUET, T. Marker imputation with low-density marker panels in Dutch Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.11, p.5487-5494, 2010.

ZHU, M.; ZHAO, S. Candidate gene identification approach: progress and challenges. **International Journal of Biological Sciences**, v.3, p.420-427, 2007.