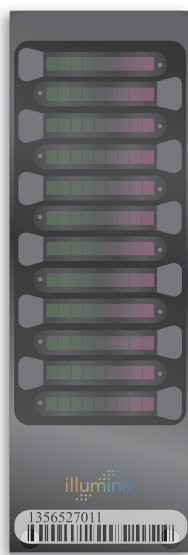




# Hur väljer man lämpliga SNP för produktion av SNP-chip?



©2008, Illumina Inc. All rights reserved.

Av  
Josefina Liljestränd

Engelsk titel: Production of SNP-chip  
Handledare: Anne Loberg och Hossein Jorjani  
Inst. för husdjursgenetik  
Examinator: Freddy Fikse

---

Husdjursvetenskap - Examensarbete 15hp  
Litteraturstudie  
SLU, Uppsala 2009

## Sammanfattning

Den här litteraturoversikten ger en inblick i hur SNP:ar identifieras och valideras men även hur de kommer påverka avelsarbetet genom genomisk selektion. Den nya identifieringstekniken av SNP med hjälp av reduced representation libraries (RRLs) har gett stora möjligheter för produktion av högkapacitetschip, innehållandes tiotusentals SNP:ar. Vet man säkert att det är lämpliga SNP:ar som används i chipen? Det som görs är en validering av SNP:ar genom kontroll av deras polymorfism och att de har en minor allele frequency (MAF) över 0,1. Frågan är hur väl kontrollerna genomförs. Även en viktig fråga är i vilka och hur många djur analyserna som ligger bakom chipen utförts på. Beroende på hur mycket av genomet som sekvenserats är förutsättningarna olika för olika djurslag. På nötkreatur har det gjorts mest bland våra husdjur. Genomisk selektion har slagit sig in i avelsvärlden och intresset har blivit stort i många länder. Tillämpning av den nya selektionen har redan börjat och kommer förhoppningsvis leda till att avelsframstegen blir noggrannare, snabbare och billigare.

## Abstract

This review paper gives an insight in how SNPs can be identified and validated. It also shows how they will influence breeding by genomic selection. The new method of identifying SNPs with reduced representation libraries (RRLs) gives great possibilities when designing a high-capacity chip, with thousands of SNPs. Is it suitable SNPs that are used in the chip? The validation of SNP is done by testing their polymorphism in the target population and requiring that the minor allele frequency (MAF) exceeds 0.1. An important question is also which and how many animals the tests have been performed on. Depending on how much of the genome that has been sequenced the possibilities are varying for different species. There has been done much research in cattle, in comparison with other livestock animals. Genomic selection has become a hot topic in the world of genetics and breeding. Many countries show their interest in this new development and hope that the breeding progress will become more accurate, rapid and cheaper.

## Introduktion

Genomisk selektion är nu ett mycket omtalat ämne inom avelsvärlden. Det har kommit att bli ett nytt redskap för att kunna välja ut de bästa avelsdjuren. Tidigare användes fenotypvärden och släktskapsinformation för att skatta avelsvärden, men med ny information om den genetiska variationen mellan djur kan avelsframstegen bli mer noggranna, processen gå fortare och bli billigare (Schaeffer et al., 2006; König et al., 2009). För genomisk selektion används Single Nucleotide Polymorphisms (SNP:ar) som markörer, dessa är naturliga variationer i arvsmassan som endast berör en nukleotid och som skattats inträffa var 1000 baspar (bp) (Long *et al.*, 2008). Genom att använda dessa markörer kan gener som t.ex. är förknippade med produktionsegenskaper, hälso- och funktionsegenskaper eller genetiska sjukdomar identifieras (Kaminski *et al.*, 2006). Idag tillverkas det SNP-chip där omfattande antal granskade SNP:ar med känd allelfrekvens sammanställts till chip. Att konstruera dessa bygger på att man har tillgång till ett stort antal SNP:ar med känd position i genomet och att det gjorts en estimering av minor allele frequency (MAF) inom målpopulationen (Van Tassell *et al.*, 2008). MAF är frekvensen av den allelen som är mindre frekvent i den specifika populationen. På grund av brist på genomsekvenser mellan och inom arter och tillräckligt effektiva program för hög-densitet genotypning, är identifiering av gener och mutationer som ger den genetiska variationen i viktiga husdjursegenskaper begränsad (Wiedmann *et al.*,

2008). Nyligen har dessa begränsningar övervunnits i de flesta produktionsdjur, på grund av att en större sekvensering av genomet är möjligt och ger tillgång till tusentals SNP:ar. Utvecklingen av nya tekniker för SNP genotypning, så som användning av reduced representation libraries (RRLs), har gjort att det går att genotypa en SNP med mycket liten osäkerhetsgrad för under 1 US cent per djur.

I många länder är intresset stort att följa med i denna våg av ny information och det finns förhoppningar om betydligt högre avelsframsteg. Att använda avelsvärdet baserat på fenotypinformation och det genomiska avelsvärdet görs redan, även här i Sverige. Framförallt gäller detta Holstein men andra mjölkkraser är på god väg att även de bli selekterade utifrån genomiska avelsvärden (Viking Genetics, 2009). Nu pågår en kamp om att hitta de bästa teknikerna för upptäckter, validering och karaktärisering av SNP:ar mellan de företag som slagit sig in på marknaden. Då detta är så pass ny kunskap kan man fundera på hur säker den verkligen är. Hur kan man vara säker på att det är lämpliga SNP:ar som används i chipen? Vilka chip är relevanta att använda till vissa arter och raser? Och vilken information ligger bakom produktionen av chip för att vi ska kunna lita på chipen?

Syftet med denna litteraturöversikt är att försöka utvärdera de analyser som gjorts angående SNP upptäckter och ge en förklaring på hur man idag väljer lämpliga SNP för produktion av SNP-chip.

## Historisk bakgrund

För över 50 år sedan upptäckte Rosalind Franklin (1953) strukturen av DNA-molekylen. Tillsammans med teorier om gener och skillnader mellan egenskapers arvbarhet började det redan då föreställas om hur de genetiska skillnaderna kunde komma att utnyttjas för avelsarbetet. Under detta årtionde kom även stora framsteg inom aveln med tekniken artificiell insemination (AI) och möjligheten att använda datorn som hjälpmedel. I och med AI började avelsvärdering användas i en allt större utsträckning. I slutet av 60-talet kom nästa era av förändringar då selektionsindexteorin kunde tillämpas ordentligt med hjälp av datorer. Detta gjorde det möjligt att skatta avelsvärden över storskaliga populationer. Under 80-talet kom den stora övergången till BLUP-metoden där stora stambokförda prestationer kunde lagras i databaser. Samtidigt skedde det stora framsteg inom molekylärgenetiken, bassekvensen i DNA:t var fortfarande oviss men det hade börjat användas specifika polymorfa platser i kromosomen, t.ex. restriction fragment length polymorphism (RFLP) och mikrosatelliter, för identifiering av gener som påverkade egenskaper. Efter att de första kartläggningarna av kopplingar i genomet hade gjorts började forskning om hur polymorfismen i gener kunde påverka skillnader i prestation, dvs. sökandet efter quantitative trait loci (QTLs) började (Green, 2009).

De senaste åren har det skett mycket inom molekylärgenetiken; en stor del av anledningarna till framgångarna är intresset för människans arvs massa och på så sätt dess delaktighet i människans hälsa (Green, 2009). År 2005 var sekvenseringen av människogenomet klart (International HapMap Consortium, 2005). Stora sekvenseringar har även gjorts hos höns, nötkreatur och häst medan det på gris och får ännu inte gjorts i lika stor skala (Green *et al.*, 2007). I och med denna forskning har det samtidigt utvecklats verktyg för fortskridning av avelsarbetet, genom upptäckter av SNP:ar.

## Metoder för identifiering av SNP:ar

Två av de största metoderna för identifiering av SNP:ar är APEX (Arrayed Primer Extension) och sekvensering av RRLs (reduced representation libraries). Andra metoder är t.ex. RFLP som är enzymläsa, medan SSCP (Single strand conformation polymorphism) och DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) är baserade på DNA:ts fysikaliska egenskaper, t.ex. mobilitet och dehydreringstemperatur (Kaminski *et al.*, 2006). Oavsett vilken metod som används isoleras alltid genomiskt DNA som tagits från t.ex. blod eller sperma från djuren först. För att skilja mellan de äldre metoderna, där ett mindre antal SNP:ar kan identifieras mot de nya metoderna där tusentals SNP:ar identifieras, benämns de lågdensitetsanalys respektive högdensitetsanalys. Här tas en av de vanligaste metoderna för de två olika analyserna upp.

### Lågdensitetsanalys - APEX

APEX är en lågdensitetsanalys eftersom den endast kan identifiera tiotals till hundratals SNP:ar. Först isoleras genomiskt DNA från de djur som ska användas och med hjälp av PCR-teknik erhålls genfragment innehållandes SNP:ar. Därefter kan identifieringen börja. APEX är en enzymläsa metod där en sekvensreaktion sker på en ankrad oligonukleotid med dess 5'ände mot en glasskiva och dess avslutande ände, 3', mot en nukleotid före det polymorfa området. Förlängning med en florerandemärkt dideoxynukleotid som kompletterar DNA-sekvensen avslöjar polymorfismen (Kaminski *et al.*, 2008a).

I en grisstudie gjord av Kaminski *et al.* (2008a) visade APEX ge 85 SNP:ar, varav 73 visade sig vara polymorfa vid valideringen i 88 galtar, och hade kända positioner på den fysikaliska kartan, där flera var QTL eller granne till QTL. Av de polymorfa SNP:arna var det 21 med MAF under 0,1, vilket sammanlagt gjorde att 33 SNP:ar av 85 gav för lite information. För att kunna användas som SNP bör den vara polymorf och dess MAF vara 1% eller mer i populationen. Målet i denna studie var att göra ett SNIPORK chip som gör det möjligt att genotypa många SNP samtidigt hos gris. Med hjälp av detta kan sedan geninteraktioner studeras och förståelse fås för den genetiska bakgrunden till grisköttmängd och kvalitet. I försöket blev 94,5% av djuren framgångsrikt genotypade för de 85 SNP:arna. Detta värde brukar variera stort mellan försök och laboratorier. Säkerheten som man utvärderar genom att jämföra bekräftade SNP:ar mellan far och son blev i detta fall 97%. För att förbättra både säkerheten och antal genotypade djur anser Kaminski *et al.* (2008a) att man bör fokusera på att öka DNA kvaliteten. Man bör även uppdatera chipen hela tiden med ny data eftersom sekvensering av grisgenomet kommer att visa på nya kandidatgener.

### Högdensitetsanalys - sekvensering av RRLs

En högdensitetsanalys betyder att tusentals SNP:ar identifieras, valideras och karaktäriseras i en enda analys. Förmågan att konstruera högdensitet SNP-analyser kräver utveckling av effektiva och billiga metoder för identifiering av ett stort antal SNP med känd position i genomet och dess MAF. Det är svårt och kostsamt att utveckla dessa analyser för de flesta arter eftersom det saknas genominformation, detta kan dock göras möjligt genom att utveckla RRLs. RRLs är representativa delar av genomet som konstrueras för att minska komplexiteten av det (Van Tassell *et al.*, 2008).

Nyligen har det kommit en ny metod som använder RRLs för SNP identifiering och estimering av MAF. Genom att samla DNA-prover från ett stort antal avlägset relaterade individer, kombinerat med sekvensering av små fraktioner av genomet med RRLs lyckades Van Tassell *et al.* (2008) identifiera ett stort antal SNP:ar.

I försöket gjordes först en *in silico* klyvning av Btau3.1 med restriktionsenzymmer för att identifiera fragment inom storleken 70-200 bp. Btau är det arkiv av nötkreaturs genomsekvens som finns att tillgå och gavs ut 2006. För att ta bort repetitiva fragment valdes restriktionsenzymet HaeIII. Efter *in silico* analysen preparerades tre DNA prov från olika nötkreaturspopulationer, dessa fick på samma sätt processas med HaeIII för att undvika repetitiva delar. Genom att inkludera 132 kromosomer från åtta olika nötraser antogs alla SNP:ar inom de kartlagda fragmenten komma med. Av de 132 kromosomerna var 30 kromosomer tagna från en holstein population, 70 kromosomer tagna från en angus population och 32 från en population med flera olika kötraser. I de fragment som precis passade till Btau3.1 hittades 62 042 förmodade SNP:ar. Av dessa kunde 23 357 SNP:ar genotypas med hjälp av Illumina iSelect Genotyping Platform, varav 21 463 SNP:ar visade sig vara polymorfa. För de polymorfa SNP:arna var medelvärdet för MAF 0,272 (Van Tassell *et al.*, 2008).

Viktigt är även att försöket gav estimeringar av allelfrekvenser i populationerna och kunde identifiera SNP:ar med fixa allelskillnader mellan populationerna. SNP:ar med stora skillnader i allelfrekvens mellan populationerna är starkt relaterade till en sjukdomsfenotyp och är troligen i kopplingsjämvikt med sjukdomsriskloci (Van Tassell *et al.*, 2008).

Att konstruera RRLs har även gjorts av Wiedmann *et al.* (2008) för att kunna identifiera många SNP:ar i gris. Tidigare har brist på lämpliga SNP för genotypning varit en stor begränsning för högdensitetanalyser på gris. I det här fallet designades de representativa delarna av genomet med en längd på 450 bp. Ett hinder vid preparering av biblioteken var att det var svårare att undvika att få med repetitiva delar än vad försöket på nötkreatur var. Detta på grund av att de flesta repetitiva delarna i gris inte innehåller många restriktionsenzymplatser. Det identifierades 115 572 SNP:ar, av dessa testades 176 och 168 visade sig vara polymorfa i de 21 galtar som de validerades i. Medel MAF för dessa var 0,28 (Wiedmann *et al.*, 2008).

Eftersom RRLs minskar komplexiteten, kravet på storleken och vetskapen om genomet är det en bra metod för att identifiera SNP i arter utan fullständig genomsekvens (Wiedmann *et al.*, 2008).

## SNP-chip

SNP-chip utgör information om ett djurs genom, t.ex. placering och genotyp av en SNP (Scharpf *et al.*, 2007). För att göra ett chip sammanställs de DNA sekvenser som är av intresse genom fästning på en fast yta av glas eller silicon. De två största företagen på marknaden just nu är amerikanska Affymetrix och Illumina. Affymetrix och Illumina har chip för bland annat människa, nötkreatur, hund, höna, råtta och mus. För människa finns chip som täcker hela genomet (Affymetrix, 2009; Illumina, 2009). När det görs chip för de andra arterna väljs det ut vilka SNP:ar, av dem man identifierat, som är relevanta att ha med. För att godkänna dessa SNP:ar bör de vara jämt fördelade över hela genomet hos många av artens raser. De ska vara polymorfa och ha en MAF på 2% eller mer enligt Muir *et al.* (2008).

SNP-chip kan delas in i hög- och låg-kapacitetschip. Högkapacitetschip gör det möjligt att genotypa tusentals SNP:ar, medan lågkapacitetschip som SNIPORK med tiotals eller hundratals SNP:ar belägna i utvalda gener kan genotypas. Företag som Affymetrix och Illumina använder sig av högkapacitetmetoder för att kunna göra så stora chip som möjligt (Kaminski *et al.*, 2008a).

## Produktion av chip

Affymetrix har ett nötkreaturchip kallat Affymetrix 25K Bovine Array, detta kan kontrollera 25.000 SNP:ar. Dessa SNP:ar validerades i över 15 olika raser bland *Bos taurus* och *Bos indicus*. Ett stort antal av dessa SNP:ar kom från det arkiv Kathkar *et al.* (2007) hade analyserat i 1000 holstein-friesian kor. Genom att använda detta chip ska man kunna undersöka egenskaper som sjukdomsresistens och kött- och mjölkproduktion (Affymetrix, 2009). Norge använder sig bland annat av Affymetrix 25K Bovine array (Interbull, 2008).

Illumina har det så kallade BovineSNP50 Genotyping BeadChip som innehåller över 54 000 SNP:ar som sträcker sig över hela genomet. Detta gör det möjligt att mer effektivt identifiera QTL och göra avelsvärderingar. För att få fram detta chip designades 12 000 prover som skulle användas för att validera SNP:ar som ingår i Bovine HapMap Consortium. Detta konsortium har genotypat 500 nötkreatur i 19 olika raser (se Tabell 1). Utöver dessa 19 raser har två anoa och två vattenbufflar även tagits med. Över 23 000 SNP prover på BovineSNP50 Beadchip upptäcktes av Van Tassell *et al.* (2008) vid användandet av RRLs. Över 9000 prover på detta chip har tagits från det officiella referensgenomet, Btau. Utöver dessa sammanlagt 44 000 SNP:arna har utvecklarna valt loci som matchar icke-kartlagda områden för att garantera en så omfattande täckning som möjligt (Illumina, 2009).

Efter att alla 54 000 SNP prover sammanställts till BovineSNP50 Genotyping BeadChip validerades detta i 19 olika kött- och mjölkkraser (se Tabell 2) och har en medel MAF på 0,25 (Illumina, 2009). Denna validering visade på goda resultat, där polymorfismen var hög och med en godkänd MAF. Mer än 52 000 SNP prover på detta chip matchar till Btau4.0. Bovine SNP50 Genotyping BeadChip är nu det mest använda, även Viking Genetics här i Sverige använder detta som chip (Interbull, 2008). I Nederländerna använder man ett specialbeställt SNP-chip vid namn Customized CRV Illumina 60K BeadChip. På Nya Zeeland används både Customized CRV Illumina 60K BeadChip och Illumina Bovine SNP50 BeadChip (Interbull, 2008).

Både i Affymetrix och Illuminas nötkreaturchip har ett stort antal SNP:ar validerats mot Btau3.1. Detta arkiv av nötsekvenser gjordes under ”bovine sequencing project” och kom ut 2006, det uppdaterades sedan till Btau4.0 år 2007. Utvecklingen av Btau gjordes bl.a. genom sekvensering av en herefordtjur (Human Genome Sequencing Center, 2009).

Tabell 1. Antal genotypade djur per ras i Bovine HapMap Consortium (efter Bovine Tissues and DNA Inventory Database, 2009)

Ras	Antal
Anoa	2
Holstein	55
Santa Gertrudis	26
Jersey	28
Brahman	38
Norwegian Red	25
Hereford	28
Limousin	42
Angus	27
Charolais	24
Guernsey	21
N'Dama	44
Red Angus	12
BeefMaster	24
Nellore	24
Gir	24
Romagnola	24
Brown Swiss	25
Piedmontese	24
Sheko East African breed	20
Water Buffalo	2

Tabell 2. Antal genotypade djur per ras i BovineSNP50 BeadChip (efter Illumina, 2009)

Ras	Antal
Holstein	64
Santa Gertrudis	24
Jersey	28
Brahman	25
Norwegian Red	21
Hereford	32
Limousin	45
Angus	60
Charolais	26
Guernsey	21
N'Dama	25
Red Angus	15
Beefmaster	24
Nellore	21
Gir	24
Romagnola	24
Brown Swiss	24
Piedmontese	24
Sheko	20
övriga*	18

\*övriga: *Bos bison*, *Bos gaurus*, *Bos grunniens*, *Bos javanicus*, *Bubalus depressicornis*, och *Syncerus caffer*.

## Hur informativa är olika SNP:ar?

Det är viktigt att granska hur SNP:arna har validerats, på hur många djur och i vilka raser. Antalet SNP:ar som med dagens metod hittats må vara många men hur informativa är de? Ytterst sällan tas det upp i vilka regioner de SNP:ar som hittats är belägna. Det bör vara väsentligt att veta om de är lokaliserade i icke-kodande regioner eller inte. Detta på grund av den alltfjämt ovissa kunskapen om dessa regioner.

Även om många av miljontals SNP:ar har en mycket liten effekt på genreglering och proteinaktivitet finns det de som kan ha en mycket stor påverkan (Chorley *et al.*, 2008). Det finns SNP:ar som är belägna i de icke-kodande regionerna av genomet och inte har någon direkt påverkan på genprodukten. De kan dock inverka på genuttryck. Inom en kodande sekvens kan en SNP vara en mutation som antingen är silent (ingen påverkan på aminosyrasekvensen), missens (ger en annan aminosyra), eller nonsens (resulterar i ett för tidigt stopp-kodon). I försöket där SNIPORK chip producerades inkluderades missense SNP:ar och SNP:ar lokaliserade inom regulatoriska regioner (Kaminski *et al.*, 2008a). SNP:ar som direkt påverkar proteinaktiviteten eller som finns inom en reglerande region i genomet har varit lätta att studera och information om dessa finns därför. Det är dock svårare att studera effekten av de SNP:ar som finns i de förmodade regulatoriska områdena i genomet. Detta beror på att det saknas vetskap om de icke-kodande sekvenserna i genomet. Olika metoder finns för att kunna se vilka SNP:ar som bör selekteras från de förmodade regulatoriska regionerna, men de borde bli snabbare och lättare att utföra (Chorley *et al.*, 2008).

Något annat som dessa SNP-chip har bidragit till är att identifiera gener och mutationer som orsakar ärftliga sjukdomar. På grund av det utbredda användandet av elithanar med artificiell insemination har det lett till ökad frekvens av genetiska defekter. I ett försök på mjölkkor visade det sig att SNP-chip med en markörtäthet på en SNP per 55kb tillåter en effektiv lokalisering av mutationer som orsakar ärftliga sjukdomar. I det fallet användes antingen 25K Affymetrix SNP-chip eller ett specialtillverkat 60K Illumina chip (Charlier *et al.*, 2008).

## Interaktioner

Det antas att SNP allelerna ärvs tillsammans med QTL eftersom de är fysiskt nära varandra eller kopplade till varandra (t.ex. Kaminski *et al.*, 2008a). Analyser har även gjorts som belyser hur viktigt det är att inte bara titta på enkel SNP effekt utan även interaktioner mellan SNP:ar (Kaminski *et al.*, 2008b). I detta försök av Kaminski *et al.* (2008b) studerades SNP:ar och kandidatgener som är associerade med mjölkproteinsyntes. Korrelationen mellan SNP:ar och mjölkproduktionsegenskaper visade att enkel SNP effekt endast fanns i fyra av 44 undersökta gener medan 22 kombinationer av SNP:ar i dessa gener hade effekt på mjölkproduktionen. Interaktionerna visade sig kunna vara både positiva och negativa. De negativa kunde bland annat vara att SNP:ar i en växthormongen hindrade den positiva effekten av en SNP på mjölmängd. Genomsambandsstudier av SNP kommer tillsammans med kopplingsanalyser identifiera många viktiga gener. Vilken roll specifika variationer har i genuttryck kommer dock förbli svår att lösa (Kaminski *et al.*, 2008b).

En annan studie gjord av Lee *et al.* (2008) visar också på att det är viktigt att tänka på att produktionsdjurens egenskaper är multifaktoriella, d.v.s. påverkas av åtskilliga gener och deras interaktioner med miljömässiga faktorer. Det presenteras därför en metod för att hitta interaktionseffekter av SNP:ar. Även Lee *et al.* (2009) anser att skatta den genetiska interaktionseffekten bör vara av högsta prioritet eftersom de ekonomiskt viktiga egenskaperna påverkas av interaktionseffekter bland SNP:ar under olika miljöpåverkan.

## Associationsstudier

För att belysa att det inte bara krävs bra chip ska det poängteras att användandet av SNP-chip kräver ett väl planerat försök. Enligt Lawrence *et al.* (2005) krävs det noggrann planering av användandet av SNP-chip eftersom det finns tekniska och kostnadsmissiga begränsningar vid analyser av SNP:ar och andra kopplingsjämnviktsbaserade metoder.

I en studie av Auvray *et al.* (2007) undersöktes hur man bäst designar en analys för användandet av SNP-chip till våra lantbruksdjur. I försöket användes sex olika modeller för att göra en genomsambandsstudie. Dessa innehöll bland annat genotypning av fäder med deras avkommor, genotypning av slumpmässigt utvalda djur och genotypning av djur från ”ändan” av den fenotypiska fördelningen (de mest extrema). Resultat visade att den bästa styrkan av samband i genomet fås genom att använda många djur. En modell med genotypning av extrema djur var bättre än selektion av besläktade djur eller slumpmässigt utvalda. Denna studie bekräftade behovet av noggrann planering av genomsambandsstudier med SNP-chip.

## Skillnader mellan djurslag

Förutsättningarna för att kunna göra bra SNP-analyser är olika på olika djurslag beroende av hur mycket av genomet som sekvenserats. Hos människa har totalt 4,4 miljoner SNP:ar blivit genotypade (International HapMap Consortium, 2007), i höna har 2,8 miljoner SNP:ar



identifierats (International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004), i hund har mer än 2,5 miljoner SNP:ar identifierats (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) och i kor har över 60 000 identifierats (Van Tassell *et al.*, 2008).

## **Nötkreatur**

Inom nötkreatur har det gjorts mer än i andra produktionsdjur. De flesta studier gjorda på mjölkkor har gjorts på holsteinlinjer. Särskilt ekonomiskt viktiga egenskaper med medel till hög arvbarhet som t.ex. mjölmängd och mjölkkomposition har studerats flitigt (Daetwyler *et al.*, 2008; Khatkar *et al.*, 2004). QTL associerade med funktionella egenskaper har börjat studeras mera (Schnabel *et al.*, 2005) och även de med låg arvbarhet som fertilitetsegenskaper (Boichard *et al.*, 2003).

I försöket av Kaminski *et al.* (2006) med APEX-metoden för produktion av lågkapacitetschip användes fyrahundra polska holsteinkor, alla döttrar från fem tjurar. Detta var enligt författarna för få djur och de tyckte även att djuren bör delas in i en kontrollgrupp och en fallgrupp. Problemet med mjölkkor är att deras produktionsegenskaper är kvantitativa och inte kan delas in i kontroll och fall. Dessutom är det svårt att hitta en stor besättning i vilka korna inte kommer från samma tjur så att effekten av tjur och besättning kan uteslutas (Kaminski *et al.*, 2006).

Med den nya tekniken som använder sig av RRLs används mycket få djur. I försöket av Van Tassell *et al.* (2008) användes endast 66 boskap från flera olika populationer för att hitta/leta efter SNP:ar. Av dessa 66 djur representerade femton djur olika holsteinlinjer, 35 var angus tjurar och två tjurar var från raserna charolais, gelbvieh, hereford, limousin, red angus och simmental.

## **Gris**

Eftersom relativt lite information om sekvensvariation hos gris finns att tillgå har det inte gjorts lika stora framgångar i genomisk selektion hos detta djurslag. Det har däremot nyligen gjorts en analys med hjälp av RRLs för att kunna identifiera många och säkra SNP:ar i gris. I försöket användes DNA från 21 obesläktade galtar representerande sju av de populäraste raserna: duroc, landrace, yorkshire, large white, hampshire, berkshire och pietrain (Wiedmann *et al.*, 2008). I ett tidigare försök med APEX användes 88 galtar av raserna pietrain, landrace, large white, duroc och hampshire x pietrain korsningar (Kaminski *et al.*, 2008a).

## **Fjäderfä**

Redan 2004 hade det i hönsgenomet hittats 2,8 miljoner SNP:ar. För att godkänna dessa SNP:ar gjordes ett chip med 3072 SNP:ar som skulle genotypa 2576 DNA-prov från kommersiella och andra fåglar. Över 90% av SNP:arna blev godkända eftersom de var polymorfa och hade en MAF på över 2%. Denna studie visade även att de kommersiella linjerna hade förlorat 70% eller mer av sin genetiska mångfald på grund av intensiv selektion för kött och äggegenskaper. Även den hårda konkurrensen som lett till att fjäderfäaveln styrs av få multinationella företag har orsakat detta (Muir *et al.*, 2008).

## **Får**

Framtill nyligen fanns det ingen information om SNP:ar i fårgenomet men i en studie av Kijas *et al.* (2009) gjordes den första uppsättningen. Detta gjordes genom omsekvensering av över

2600 markörer vilka hade känd placering i genomet. För att sedan testa de identifierade SNP:arna gjordes en chip-baserad genotypning i 23 domesticerade raser och två vilda raser. Med ytterligare analyser visade det sig att får hade svag fylogeografisk struktur, överlappande genetisk likhet och generellt låg differentiering. Orsaken till detta tordes bero på deras korta evolutionära historia (Kijas *et al.*, 2009).

## Genomisk selektion

### Spridning internationellt

På nötkreaturssidan har det skett en snabb ökning av länder som tänker börja inkludera genomisk information i avelsvärdena. En undersökning gjord av Interbull (2008) visade att elva länder, bl.a. Frankrike, Tyskland, Kanada, USA och Nya Zeeland, planerar att börja med inkludering av genomisk information under 2009 och 2010. Alla dessa säger att konventionella avelsvärden fortfarande kommer att beräknas (Interbull, 2008). I ett försök av Van Raden *et al.* (2009) kombinerades det skattade konventionella avelsvärdet (EBV) med det genomiska avelsvärdet för att få bästa resultat.

### Framtiden

Genomisk selektion ska förhoppningsvis leda till ökad säkerhet i avelsarbetet, särskilt för egenskaper med låg arvbarhet, och ge större genetisk vinning med kortare generationsintervall och högre selektionsintensitet. Tillämpningen av genomisk selektion i mjölkkor hoppas man ska kunna leda till minskad avkommeprövning. Om det inte behövs lika många stambokförda och fenotypade djur skulle det ge en stor ekonomisk vinst. Är säkerheten redan hög med EBV kan vinningen bli liten med genomisk selektion men för svåra egenskaper, som t.ex. har låg arvbarhet eller/och är svåra att mäta, blir vinningen större. För avelsföretagen leder troligen tillämpningen av genomisk selektion till lägre kostnader med över 90% (Schaeffer, 2006).

I en studie på nordamerikanska holstein av Van Raden *et al.* (2009) skattades ökningen i säkerhet vid användning av genomisk selektion. De dokumenterade hur densiteten av markörer och antal genotypade tjurar påverkar förmågan att förutse avelsvärden. Resultatet visade att vinningen från genomisk data ökade linjärt med antal genotypade tjurar och ökade stabilt ju fler SNP:ar som var inkluderade. Det nämns även att mer avvikande populationer troligen kräver större SNP densitet.

Genomisk selektion behöver en referenspopulation som SNP effekterna kan skattas på. Dessa är skilda från de djurkandidater som kan bli selekterade. Djuren i referenspopulationen ska ha både fenotyp och genotypvärden medan de i selektionsgruppen bara behöver markörgenotyper. Det spekuleras i att det skulle ge en stor ekonomisk vinst då det inte behövs registreras lika många stambokförda och fenotypade djur. Det kommer dock krävas ett stort antal djur med genomiskt avelsvärde och fenotypiskt avelsvärde för att kunna skatta QTL effekterna (Goddard *et al.*, 2007). Dessa djur som då tillhör referenspopulationen bör vara några tusen; enligt Schaeffer (2006) bör det vara minst 2500 djur. Genomisk selektion innebär också att selektionsgruppen kan bli avelsvärderade för vilken miljö som helst där det finns en förutspådd ekvation för just den miljön. Konsekvensen kan dock bli den att specialiserade raser ersätts av en generell population som det kan göras förutspådda ekvationer på för en speciell miljö (Goddard *et al.*, 2007).

Frågan är hur stor del av den genetiska variationen som kan beskrivas av markörer eftersom det är beroende av kopplingsojämvikt mellan QTL och en markör eller kombinationen av

markörer. Troligen är inte markörerna jämt fördelade över genomet och dessutom kan vi inte förutse hur kopplingar förändras, vilket gör att man troligen inte kan förvänta sig att alla QTL har en SNP i full kopplingsjämnvikt med dem (Goddard *et al.*, 2007). Därför kommer framgången av genomisk selektion att bero på styrkan av kopplingsjämnvikt mellan markörer (Sargolzaei *et al.*, 2008).

Den genomiska informationen som blir tillgänglig kommer göra det möjligt att förstå effekter som epistasi och dominans. Forskare inom ämnet kommer söka svar på hur interaktioner av gener, proteiner, mekanismer och miljömässiga faktorer bildar djurets fenotyp (Green, 2009).

Genomisk selektion kommer antagligen förändra strukturen av produktionsdjurens avelsprogram drastiskt (Schaeffer, 2006). Nötkreatur- och fårproducenter i de flesta i-länder har EBV som jämför alla tillgängliga avelsdjur. Inom mjölkkor står Interbull för EBVn som kan jämföras världen över. Situation är mycket gynnsam för producenterna men frågan är om genomisk selektion nu kommer förändra denna struktur (Goddard *et al.*, 2007). Det kommer ändå troligen vara upp till djuruppfödarna hur genomisk och fenotypisk data ska integreras i varandra och göra det möjligt för en ny tid av förbättrad djurhållning och noggrannare avelsarbete (Green, 2009).

## Diskussion

Den senaste forskningen med användandet av RRLs kommer göra det möjligt för de flesta produktionsdjur att få ett chip där SNP:ar med information om ekonomiskt viktiga egenskaper, härstamning hos djuret och även vetskap om genetiska defekter kommer att vara samlade. Särskilt för arter med lite mindre mängd sekvenserat genom kan SNP upptäckter optimeras genom att använda *in silico* klyvning av sekvenser.

Det bör dock beaktas vilka djur som använts i försöken. Det kan tyckas konstigt att det räcker med 66 djur för framställning av RRL. Det nämns av Van Tassell *et al.* (2008) att de kan förbättra sina resultat både genom att öka sekvensbredden och genom att öka antal individer representerade i varje RRL. När dessa SNP:ar sedan användes för produktion av SNP-chip hos Illumina testades alla loci i 19 olika raser (se Tabell 2). Det märkliga är att de flesta SNP-chip i dagläget används på mjölkkor men tittar man på de olika raserna i tabellen visar de en majoritet kötttraser. Av de 19 raserna var tolv kötttraser och resten mjölktraser, således var 203 av 547 nötkreatur av mjölktraser. Detta betyder att endast 37% av djuren var av mjölktraser. Om det jämförs med djuren som genotypats i bovine HapMap consortium ser det mycket lika ut (se Tabell 1), även där var tolv av 19 raser kötttraser. I många fall ser det ut att vara samma djur som använts, t.ex. är det exakt lika många djur i raserna Beefmaster, Gir, Romagnola, Guernsey, Piedmontese och Jersey. Betyder detta att samma djur har använts? Om så är fallet är det självklart att genotypningen av Illumina BovineSNP50 Genotyping BeadChip visade på mycket goda resultat. Det bör ha testats i djur som inte använts tidigare för att kunna annonseras ut som ett chip "that could be used to investigate genetic variation in any cattle breed" (Illumina, 2009). I denna litteraturstudie har det valts att fokusera på Illumina BovineSNP50 Genotyping BeadChip eftersom det är den mest använda. Även de raser som användes för konstruktion av RRLs var till största delen kötttraser.

Det bör nämnas att den genomreferens, Btau3.1, som de flesta SNP:ar har matchats emot, grundar sig i sekvenseringen av en herefordtjur. Det tycks märkligt att Btau3.1 användes i försöket av Van Tassell *et al.* (2008) eftersom den uppdaterade versionen Btau4.0 kom ut

2007. Troligen hann inte denna användas i detta försök. Det hade varit intressant att se om det blev någon skillnad med Btau4.0 som referensgenom.

Hur kan det dras slutsatser om lämpliga SNP:ar för mjölkkor när de flesta har validerats i köttraser? Eftersom det är i USA dessa chip har utvecklats är självklart många av deras raser inkluderade. Det återstår därför att se hur väl dessa chip fungerar för t.ex. svensk röd boskap. Med den fakta som framställts bör Illumina BovineSNP50 Genotyping BeadChip vara mer lämpad att användas till avelstjurar inom vanliga köttraser.

Anledningen till att Bovine SNP50 Genotyping BeadChip är det mest använda för nötkreatur verkar vara att det är det mest kommersiellt tillgängliga. Länder som Nederländerna och Nya Zeeland har försökt att gå ett steg längre genom att använda specialtillverkade chip. Troligen är detta klokt eftersom man då beprövar vilka SNP:ar som är polymorfa i den aktuella populationen. I de försök där identifiering av SNP:ar har gjorts visas en välgjord validering eftersom de ofta prövar polymorfismen flera gånger och aldrig har en MAF under 0,1. Även om det i nuläget redan finns stora chip för att kunna hitta QTL av olika former är utvecklingen av hela genomchip på väg för många arter. Ett problem med användandet av chip kommer troligen vara att det krävs referenspopulationer av en viss storlek. Detta kan orsaka problem för djur i små populationer eller i små länder.

I artikeln av Van Tassell *et al.* (2008) nämns inte vilka slags SNP:ar som hittats. Även om det är hela genomstudier vore det intressant att veta om många av SNP:arna är placerade i icke-kodande DNA som i Kaminski *et al.* (2008a) APEX-försök. Kanske är det så att det inte spekuleras i huruvida SNP:arna är placerade eftersom de tar upp en stor del av genomet med jämna mellanrum. På så sätt tycks alla slags SNP:ar fångas in.

Analysen som gjordes av Kaminski *et al.* (2008b) visar hur viktigt det är att titta på interaktioner mellan SNP:ar och inte bara fokusera på enskilda SNP:ar. Enligt Sargolzaei *et al.* (2008) kommer framgången av genomisk selektion framförallt att bero på styrkan av kopplingsojämvikt mellan markörer och mutationer. En viktig fråga är även hur mycket genotyp-miljösamspel påverkar. Förhoppningsvis har inte utvecklingen gått för fort så att viktiga delar av den genomiska informationen försummas, så som styrkan av genotyp-miljösamspel. Här finns det verkligen behov av ytterligare forskning. Chipen som produceras kommer behöva uppdatering allt eftersom, men hur ofta? Och hos vem kommer ansvaret ligga att veta när de bör förnyas?

I framtiden kommer det fortfarande krävas att man försöker minska olika påverkade effekter vid skattning av avelsvärdet, framförallt då vi direkt kan se hur genomets variation förändras. Inom nötkreatur är det ett stort problem att ett fåtal tjurar används och blir orsaken till minskad genetisk mångfald. För att undvika effekten av tjur och besättning bör man analysera mjölkkor som härstammar från många tjurar. Inom fjäderfä är det bland annat de multinationella företagen som gett upphov till den minskade genetiska mångfalden. Hur kommer den genetiska mångfalden att utvecklas hos nöt om vi på samma sätt som för fjäderfä fortsätter selektera för produktionsegenskaper? Om det gått ungefär 60 generationer av selektion på fjäderfä och tio generationer på nöt, kommer den genetiska mångfalden att gå förlorad till 70% (Muir *et al.*, 2008) när 60 generationer passerat även för nöt? Det har börjat läggas mer hänsyn till sjukdomsresistens, fruktsamhet, kalvningssvårigheter och hållbarhet inom koaveln så detta bör inte vara något att förvänta sig i framtiden. Dessutom kommer genomisk selektion förhoppningsvis vara en bidragande del i att få mera balancerade genetiska framsteg.

Efter att ha granskat fakta kan det nu diskuteras hur lämpliga SNP:arna är som används i chip. Analyserna för identifiering av SNP:ar tycks vara välgjorda. Vid validering i olika populationer saknas det däremot utförliga studier. För att snabbt kunna utforska SNP:arna görs genotypningarna endast på tjurar och på det som i USA anses vara ”populära” raser. Det krävs fler studier på nöt inom andra raser än vad kommersiella företag presenterat.

För att kunna möta framtiden med den nya utvecklingen kommer det krävas svar på många utmanande problem. Världens behov av mat kommer öka drastiskt de kommande åren och genomisk selektion, som ger en snabbare process och ökad säkerhet av avel, kunde inte kommit lägligare. Allmänhetens krav på djurens välbefinnande och djurvälstånd kommer att öka, vilket produktionssystemen måste ta i tu med. Kommer människor börja välja de ”naturligt” avlade djuren precis som man skiljer mellan konventionellt och ekologiskt? Det måste fortfarande påpekas hur viktigt det är med genetisk variation så att inte specialiserade raser ersätts av en generell ras som fungerar i alla miljöer. De kommersiella industriföretagen har satsat och visat stort intresse för framgångarna av förbättring av de ekonomiskt viktiga egenskaperna. Det har tyvärr inte lagts lika mycket vikt på egenskaper som hälsa, funktion och anpassning, även fast dessa är ekonomiskt viktiga på ett annat sätt. Möjligheterna kommer däremot verkligen att finnas för att bättre kunna förstå egenskaper som är svåra att mäta och egenskaper med låg arvbarhet. Strukturen kommer troligen förändras mycket inom husdjursindustrin, kanske kommer vi se en annan skillnad mellan olika husdjur. Det är tänkbart att strukturen inom nötkreatur blir som i fjäderfä, att stora företag sköter aveln själva.

## **Slutsats**

Att välja lämpliga SNP:ar görs genom kvalificerad identifiering, idag med hjälp av bland annat reduced representation libraries (RRLs), och valideringen med kontroll av polymorfism och minor allele frequency (MAF). Analyserna inom detta har utförts noggrant vad gäller SNP:arnas fördelning över genomet men det saknas information om hur väl dessa fungerar i raser som ej genotypats. Det står även oklart hur interaktioner mellan SNP:ar kan påverka framtida användning av SNP-chip.

## **Tack till:**

Illumina

Handledare Anne Loberg och Hossein Jorjani

## Referenser

- Affymetrix. April 2009. [http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/bovine\\_datasheet.pdf](http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/bovine_datasheet.pdf)
- Auvray, B., Dodds, K.G. 2007. Use of stochastic simulations to investigate the power and design of a whole genome association study using single nucleotide polymorphism arrays in farm animals. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(11):802-806.
- Boichard, D., Grohs, S., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., Rupp, R., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Levéziel, H. 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35: 77-101.
- Bovine Tissues and DNA Inventory Database. April 2009. [http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgi-bin/hapmap/affy2/a\\_viewBreed.pl](http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgi-bin/hapmap/affy2/a_viewBreed.pl), [http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgi-bin/hapmap/affy2/a\\_viewAnimal.pl](http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgi-bin/hapmap/affy2/a_viewAnimal.pl).
- Charlier, C., Coppeters, W., Rollin, F., Desmecht, D., Agerholm, J.S., Cambisano, N., Carta, E., Dardano, S., Dive, M., Fasquelle, C., Frennet, J. et al., 2008. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defect in livestock. *Nature genetics*, vol.40, no.4, pg.449-454.
- Charpf, R.B., Ting, J.C., Pevsner, J., Ruczinski, I. 2007. SNPchip: R classes and methods for SNP array data. *Bioinformatics application note*, vol.23, no.5, pg.627-628
- Chorley, B.N., Wang, X., Campbell, M.R., Pittman, G.S., Nouredine, M.A. 2008. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutation Research* 659, 147-157.
- Franklin, R.E. Gosling, R.G. 1953. Molecular Configuration in Sodium Thermanucleate. *Nature* 171, no.4356, pg.740-741.
- Goddard, M.E., Hayes, B.J. 2007. Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 124, 323-330.
- Green, R.D., Qureshi, M.A., Long, J.A., Burfening, P.J., Hamernik, D.L. 2007. Identifying the future needs for long-term USDA efforts in agricultural animal genomics. *International journal of biological sciences*, vol.3 iss.3 pg.185.
- Green, R.D., 2009. ASAS Centennial Paper: Future needs in animal breeding and genetics. *Journal of Animal Science* 87:793-800.
- Human Genome Sequencing Center. April 2009. <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/project-species-m-Bovine.hgsc?pageLocation=Bovine>.
- Illumina, April 2009. [http://www.illumina.com/downloads/BovineSNP50\\_data\\_sheet.pdf](http://www.illumina.com/downloads/BovineSNP50_data_sheet.pdf).
- Interbull, December 2008. Summary of Interbull genomic survey.
- International HapMap Consortium, 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449:851-861.
- International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 432:417-722.
- Kaminski, S., Brym, P., Rusc, A., Wojcik, E., Ahman, A., Mägi, R. 2006. Associations between milk performance traits in Hostein cows and 16 candidate SNPs identified by arrayed primer extension (APEX) microarray. *Animal Biotechnology*, 17:1-11.
- Kaminski, S., Help, H., Brym, P., Rusc, A., Wojcik, E. 2008a. Snipork- a mikroarray of SNPs in candidate genes potentially associated with pork yield and quality-development and validation in commercial breeds. *Animal Biotechnology*, 19:43-69.

- Kaminski, S., Malewski, T., Ahman, A., Wojcik, E., Rusc, A., Olenski, K., Jakubczak, A., Sazanov, A.A. 2008b. Towards an integrated approach to study SNPs and expression of candidate genes associated with milk protein biosynthesis. *Russian Journal of Genetics*, vol. 44, no. 4, pp. 459-465.
- Khatkar, M.S., Thomson, P.C., Tammen, I., Raadsma, H.W. 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.* 36: 163–190.
- Khatkar, M.S., Zenger, K.R., Hobbs, M., Hawken, R.J., Cavanagh, J.A.L., Barris, W., McClintock, A.E., McClintock, S., Thomson, P.C., Tier, B., Nicholas, F.W., Raadsma, H.W. 2007. A Primary Assembly of a Bovine Haplotype Block Map Based on a 15,036-Single-Nucleotide Polymorphism Panel Genotyped in Holstein–Friesian Cattle. *Genetics* 176: 763–772.
- König, S., Simianer, H., Williams, A. 2009. Economic evaluation of genomic breeding programs. *Journal of Dairy Science* vol.92, 382–391.
- Lawrence, R.W., Evans, D.M., Cardon, L.R., 2005. Prospects and pitfalls in whole genome association studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 360(1460):1589-1595.
- Lee, C., Kim, Y. 2009. Estimation of interaction Effects among Nucleotide Sequence Variants in Animal Genomes. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, vol.22, no.1:124-130.
- Lee, J., Kwon, J., Kim, J. 2008. Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) Analysis to Detect Single Nucleotide Polymorphisms Associated with a Carcass Trait in a Hanwoo Population. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, vol.21, no.6:784-788.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803-819.
- Long, N., Gianola, D., Rosa, G.J., Weigel, K.A., Avendano, S. 2008. Machine learning classification procedure for selecting SNPs in genomic selection: application to early mortality in broilers. *Developments in biologicals*, vol.132 pg.373
- Muir, W.M., Wong, G.K., Zhang, Y., Groenen, M.A.M., Crooijmans, R.P.M.A., Megens, H.J., Zhang, H.M., McKay, J.C., McLeod, S., Okimoto, R., Fulton, J.E., Setter, P., O’Sullivan, N.P., Vereijken, A., Jungerius-Rattink, A., Albers, G.A.A., Taylor Lawley, C., Delany, M.E., Cheng, H.H. 2008. Review of the initial validation and characterization of a 3K chicken SNP array. *World’s Poultry Science Journal*, vol.64.
- Sargolzaei, M., Schenkel, F.S., Jansen, G.B., Schaeffer, L.R. 2008. Extent of Linkage Disequilibrium in Holstein Cattle in North America. *Journal of Dairy Science*, vol.91, no.5, pg.2106-2117.
- Schaeffer, L.R. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 218–223.
- Schnabel, R.D., Sonstegard, T.S., Taylor, J.F., Ashwell, J.F. 2005. Whole-genome scan to detect QTL for milk production, conformation, fertility and functional traits in two US Holstein families. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 36, 408–416
- Van Tassell, C., Smith, T.P.L., Matukumalli, L.K., Taylor, J.F., Schnabel, R.D., Lawley, C.T., Haudenschild, C.D., Moore, S.S., Warren, W.C., Sonstegard, T.S. 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature methods*, vol. 5, no. 3.
- Viking Genetics, April 2009. <http://www.vikinggenetics.com/sv/doks/news/nyhet.asp?id=236>
- Wiedmann, R.T., Smith, T.P.L., Nonneman, D.J. 2008. SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing. *BMC genetics*, 9:81.
- Bild framsida: Illumina BovineSNP50 BeadChip, tillstånd från Illumina.