



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA SILVA MARESTONE

**USO DE PAINÉIS DE MARCADORES SNP PARA TESTE DE
PATERNIDADE E AVALIAÇÃO GENÔMICA DE EMBRIÕES
BIOPSIADOS DE BOVINOS NELORE**

Londrina
2023

BRUNA SILVA MARESTONE

**USO DE PAINÉIS DE MARCADORES SNP PARA TESTE DE
PATERNIDADE E AVALIAÇÃO GENÔMICA DE EMBRIÕES
BIOPSIADOS DE BOVINOS NELORE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Edson Luis de Azambuja
Ribeiro

Coorientadora: Dr^a. Carolina Amália de Souza
Dantas Muniz

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M325u Marestone, Bruna Silva.
Uso de painéis de marcadores SNP para teste de paternidade e avaliação genômica de embriões biopsiados de bovinos Nelore / Bruna Silva Marestone. - Londrina, 2023.
89 f. : il.

Orientador: Edson Luis de Azambuja Ribeiro.
Coorientador: Carolina Amália de Souza Dantas Muniz.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Genômica - Tese. 2. Avaliação genética - Tese. 3. Marcadores moleculares - Tese. 4. Bovinos - Tese. I. Ribeiro, Edson Luis de Azambuja . II. Muniz, Carolina Amália de Souza Dantas. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 636

BRUNA SILVA MARESTONE

**USO DE PAINÉIS DE MARCADORES SNP PARA TESTE DE
PATERNIDADE E AVALIAÇÃO GENÔMICA DE EMBRIÕES
BIOPSIADOS DE BOVINOS NELORE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Carolina Amália de S. Dantas Muniz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Simonelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Sergio Rodrigo Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Ambiel Corral Camargo
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Dr. Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária (EMBRAPA Gado de Corte)

Londrina, 27 de fevereiro de 2023.

*Aos meus pais, João e Cecília, por todo amor e
compreensão ao longo da minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por Ele colocar pessoas tão especiais ao meu lado, ao longo da vida e durante esse ciclo.

Aos meus pais, Cecília e João, pelo amor incondicional. Pelo apoio em todos os momentos dessa etapa, além de sempre acreditarem no meu potencial e por fazer eu acreditar que era capaz, mesmo quando tudo parecia impossível. Meu eterno amor e respeito.

Ao Prof. Dr. Edson Luis de Azambuja Ribeiro, por todas as oportunidades ofertadas, ensinamentos, confiança e orientação.

À Dr^a. Carolina Amália de Souza Dantas Muniz, minha orientadora, coorientadora e amiga desde os tempos da graduação com a iniciação científica, por todas as orientações, ensinamentos e conselhos, além de sempre confiar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Carneiro, pelo fornecimento do banco de dados, por toda a orientação e a oportunidade para a realização desse trabalho. Sem esse suporte, nada seria possível.

Ao Dr. Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes, pelos valiosos ensinamentos desde a minha orientação durante o estágio curricular, ao longo do mestrado e na avaliação da tese do doutorado.

Aos professores Dr. Sergio Rodrigo Fernandes e a Dr^a. Ana Claudia Ambiel Corral Camargo, por aceitarem participar da minha banca avaliadora e pelas enriquecedoras sugestões para a melhoria do trabalho.

Ao Grupo de Estudo e Pesquisa em Ovinocultura (GEPO) e aos meus amigos da graduação e pós-graduação, pelos momentos divididos ao longo dessa importante etapa da vida profissional e pelo apoio, tornando o caminho percorrido mais leve.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

MARESTONE, Bruna Silva. **Uso de painéis de marcadores SNP para teste de paternidade e avaliação genômica de embriões biopsiados de bovinos Nelore**. 2023. 89 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

Touros jovens podem ser selecionados através das avaliações genômicas e utilizados como reprodutores, proporcionando melhorias na elaboração de estratégias para o melhoramento genético de bovinos. A seleção genômica tem o objetivo de utilizar SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismos de Nucleotídeo Único) como ferramentas auxiliares na predição de valores genéticos mais acurados, contribuindo para um processo de seleção mais eficaz e auxiliando na identificação correta do parentesco e todo o *pedigree*. Assim, o objetivo do trabalho foi primeiramente avaliar diferentes densidades de painéis de marcadores SNPs na identificação da paternidade de bovinos da raça Nelore. Posteriormente, realizou-se outro estudo com o objetivo de avaliar a viabilidade da predição dos valores genéticos de embriões biopsiados, com painéis de moderada densidade e imputados para painéis com maiores densidades. No primeiro estudo foram genotipados, em painéis HD, 2027 animais, sendo 1883 produtos e 144 touros. Cinco painéis foram testados, sendo eles o painel desenvolvido pela *International Society of Animal Genetics* (ISAG) possuindo 166 SNPs (Painel ISAG), um painel contemplando 10K SNPs e três painéis customizados, contendo 98 (Painel 100), 206 (Painel 200) e 311 (Painel 300) SNPs selecionados, acrescidos de 166 SNPs provenientes do painel ISAG, para a avaliação da paternidade no software FImpute. No segundo estudo utilizou-se 93 embriões provenientes da coleta dos óvulos de 28 doadoras, que foram fertilizados *in vitro* utilizando sêmen de dois touros. Todos os embriões foram genotipados utilizando o chip 50K e posteriormente os genótipos foram imputados para o painel HD. Os embriões foram implantados nas vacas receptoras e, após o nascimento, a genotipagem de 10 bezerros foi realizada, assim como a estimativa dos seus valores genéticos genômicos. Entre os painéis customizados, o Painel 200 foi eficiente para validação do parentesco de todas as progênes. A qualidade da genotipagem dos embriões foi satisfatória, sendo o *call rate* médio das amostras de 93%, a média de heterozigosidade dos genótipos imputados (22,5%) foi maior do que nos genótipos observados (11,7%), e a correlação observada entre os índices de seleção de embrião e bezerro foi de 99,3%. Conclui-se que o painel ISAG não foi suficiente para avaliar a paternidade dos animais da raça Nelore, criados nacionalmente, sendo necessário acrescentar 206 SNPs ao painel para se obter a identificação entre touro e progênie. Os valores genéticos genômicos estimados a partir dos genótipos dos embriões biopsiados apresentaram alta correlação com os valores estimados posteriormente para os bezerros, demonstrando grande potencial de aplicação na produção animal, para seleção de animais ainda na fase embrionária.

Palavras-chave: gado de corte; ISAG; marcadores moleculares; parentesco; valor genético.

MARESTONE, Bruna Silva. **Use of SNP marker panels for paternity testing and genomic evaluation of biopsied Nelore bovine embryos**. 2023. 89 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Young bulls can be selected through genomic evaluations and used as breeders, providing improvements in the development of strategies for genetic improvement of cattle. Genomic selection aims to use SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) as auxiliary tools in predicting more accurate genetic values, contributing to a more effective selection process and aiding in correct identification of parentage and pedigree. Thus, the aim of this study was firstly to evaluate different densities of SNP marker panels in identifying the paternity of Nelore cattle. Subsequently, another study was conducted to assess the feasibility of predicting genetic values of biopsied embryos with panels of moderate density and imputed for panels with higher densities. In the first study, 2,027 animals were genotyped on HD panels, with 1,883 offspring and 144 bulls. Five panels were tested, including the panel developed by the International Society of Animal Genetics (ISAG) with 166 SNPs (ISAG panel), a panel with 10K SNPs, and three custom panels containing 98 (Panel 100), 206 (Panel 200), and 311 (Panel 300) selected SNPs, plus 166 SNPs from the ISAG panel for paternity evaluation in the FImpute software. In the second study, 93 embryos from 28 donors were fertilized in vitro using semen from two bulls. All embryos were genotyped using the 50K chip, and subsequently genotypes were imputed to the HD panel. The embryos were implanted in recipient cows, and after birth, genotyping of 10 calves was performed, as well as estimation of their genomic genetic values. Among the custom panels, Panel 200 was efficient in validating the parentage of all progenies. The quality of the embryo genotyping was satisfactory, with a mean call rate of 93%, a mean heterozygosity of imputed genotypes (22.5%) higher than observed genotypes (11.7%), and a correlation of 99.3% between embryo and calf selection indices. It was concluded that the ISAG panel was not sufficient to evaluate the paternity of Nelore animals bred nationally, and that 206 SNPs needed to be added to the panel to obtain identification between bull and progeny. The genomic genetic values estimated from biopsied embryo genotypes showed a high correlation with values estimated later for the calves, demonstrating great potential for application in animal production for selecting animals still in the embryonic phase.

Keywords: beef cattle; ISAG; molecular markers; parentage; genetic value.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – *Call rate* e heterozigose dos genótipos de 50K original dos embriões de bovinos da raça Nelore..... 74
- Gráfico 2** – Determinação do sexo dos embriões de bovinos da raça Nelore, *call rate* e heterozigosidade do cromossomo X..... 75
- Gráfico 3** – *Call rate* e heterozigosidade dos genótipos 50K original e imputados para HD dos embriões de bovinos da raça Nelore..... 76
- Gráfico 4** – *Call rate* dos genótipos 50K original dos embriões de bovinos da raça Nelore e nível de mudança nos genótipos após imputação para HD..... 77
- Gráfico 5** – *Call rate* dos genótipos 50K dos embriões de bovinos da raça Nelore e taxa de erro após a correção proveniente da imputação..... 78
- Gráfico 6** – *Call rate* dos genótipos 50K original e heterozigosidade dos embriões e respectivos bezerros da raça Nelore..... 79
- Gráfico 7** – Comparação entre o índice genético genômico estimados para os embriões e respectivos bezerros da raça Nelore..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos painéis customizadas antes da inclusão dos SNPs do painel ISAG.....	55
Tabela 2 – Descrição dos painéis utilizados para o teste de paternidade.....	56
Tabela 3 – Descrição dos arquivos utilizados em cada análise realizada para o teste de paternidade.....	57
Tabela 4 – Resultados do teste de parentesco e número de inconsistências Mendelianas (IM) entre progênie-touro sugeridos nos grupos com a paternidade correta e incorreta para os painéis testados.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCZ	Associação Brasileira dos Criadores de Zebu
ANCP	Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores
BLUP	<i>Best Linear Unbiased Prediction</i> (Melhor Predição Linear não Viesada)
DEP	Diferença Esperada na Progênie
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMM	Equações de Modelos Mistos
GAS	Seleção Assistida por Genes
GBLUP	<i>Genomic Best Linear Unbiased Prediction</i>
GEBV	<i>Genomic Estimated Breeding Values</i> (Valores genéticos genômicos preditos)
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> (Estudo de Associação Genômica Ampla)
HD	<i>High density</i> (Alta densidade)
ISAG	<i>International Society for Animal Genetics</i>
LASSO	<i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>
MAF	<i>Minor allele frequency</i> (Frequência de Alelo Menor)
MAS	<i>Assisted Selection</i> (Seleção Assistida por Marcadores)
PMGZ	Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos
PTA	<i>Predicted Transmitting Ability</i> (Capacidade Prevista de Transmissão)
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
REML	<i>Restricted Maximum Likelihood</i> (Máxima Verossimilhança Restrita)
RR-BLUP	<i>Random Regression BLUP</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
ssGBLUP	<i>Single-step GBLUP</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
σ_a^2	Variância genética aditiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE GADO DE CORTE	15
2.2	AVALIAÇÃO GENÉTICA	17
2.3	MARCADORES MOLECULARES DO TIPO SNP	22
2.3.1	MARCADORES MOLECULARES PARA TESTE DE PATERNIDADE	25
2.4	IMPUTAÇÃO DE GENÓTIPOS.....	28
2.5	AVALIAÇÃO GENÉTICA GENÔMICA.....	30
2.6	AVALIAÇÃO GENÉTICA DE EMBRIÕES BIOPSIADOS	35
3	REFERÊNCIAS	37
4	HIPÓTESE	48
5	OBJETIVOS	49
5.1	OBJETIVO GERAL	49
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
6	ARTIGO A – USO DE PAINÉIS DE SNPS DE DIFERENTES DENSIDADES PARA A REALIZAÇÃO DE TESTE DE PATERNIDADE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE	50
7	ARTIGO B – PREDIÇÃO GENÔMICA DE EMBRIÕES BIOPSIADOS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE	68
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

1 INTRODUÇÃO

O uso de animais geneticamente superiores contribui para a melhoria da eficiência econômica dos rebanhos. Nesse sentido, as avaliações genéticas permitem a identificação e seleção dos indivíduos mais produtivos, intensificando a sua contribuição e o aumento dos alelos favoráveis nas populações. O desenvolvimento de plataformas de genotipagem de marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Único) em alta densidade ao longo de todo genoma foi direcionado para a utilização na produção animal, especialmente para a bovinocultura, impulsionado por pesquisas relacionadas ao genoma bovino (ELSIK et al., 2009).

A avaliação genômica está entre as aplicabilidades para o uso das informações provenientes dos marcadores moleculares, com o objetivo de utilizar os SNPs como ferramentas auxiliares na predição de valores genéticos mais acurados, contribuindo para o processo de seleção mais eficaz. Outra importante aplicação das informações provenientes dos SNPs é o Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS), que tem como finalidade identificar os marcadores associados com características de interesse e explorar as regiões do genoma em que esses SNPs estão inseridos, buscando genes e/ou *loci* relacionados com a expressão fenotípica das características em questão (UTSUNOMIYA et al., 2013).

Dessa maneira, a combinação entre o desenvolvimento de técnicas da área da biologia molecular e as pesquisas relacionadas ao sequenciamento do genoma bovino possibilitaram adaptações nas metodologias para predição dos valores genéticos dos animais. Isso viabilizou a identificação de indivíduos de alto valor genético, principalmente para as características de interesse econômico, expressas tardiamente ou de difícil mensuração. Em gado de corte, vários trabalhos utilizaram análises genômicas para identificação de variantes genéticas de diversas características de interesse econômico, como a eficiência alimentar (PRYCE et al., 2012; LU et al., 2013; SEABURY et al., 2017). Outros estudos demonstraram ganho na acurácia da predição dos valores genéticos genômicos para características de carcaça em diferentes populações bovinas (WEBER et al., 2012; BOLORMAA et al., 2013).

Ademais, outras vantagens do uso de marcadores moleculares e das ferramentas genômicas podem ser citadas, como a correção das informações de parentesco, na qual é possível realizar a determinação da paternidade (HEATON et al., 2014; TALENTI et al., 2016), utilizando marcadores do tipo SNP conforme as diretrizes para a verificação de parentesco de bovinos desenvolvidas pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG) (ISAG, 2012). Desse modo, as informações genômicas auxiliam na correção de possíveis erros de paternidade, provenientes de falhas na escrituração zootécnica, além de proporcionarem aumento da acurácia das estimativas dos valores genéticos. Adicionalmente, o teste de paternidade é uma ferramenta valiosa na identificação da paternidade em rebanhos com reprodutores múltiplos. Outra vantagem se refere à predição do valor genético ainda na fase embrionária, através das informações derivadas da biópsia do embrião, que é um procedimento rotineiramente realizado, promovendo a seleção dos indivíduos superiores no rebanho precocemente.

Portanto, acredita-se que a utilização das ferramentas moleculares em programas de melhoramento genético animal implicaria em maior eficiência do processo de melhoramento genético, promovendo economias com adoção de metodologias de seleção modernas com utilização de animais jovens e redução no intervalo de gerações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE GADO DE CORTE

O Brasil é o país detentor do maior rebanho comercial de bovinos de corte. De acordo com o relatório da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2022), estima-se que havia no território nacional aproximadamente 196,47 milhões de cabeças em 2021, com volume de produção de carne de 9,71 milhões de toneladas carcaça equivalente, destinadas à exportação e mercado interno. Dentre as diversas raças presentes no Brasil, destaca-se a raça Nelore, de origem zebuína (*Bos taurus indicus*), que apresenta adaptabilidade ao ambiente tropical, sendo explorada em diferentes tipos de sistemas de produção nacional. Na literatura, relata-se que a entrada da raça Nelore no país ocorreu no ano de 1868, quando desembarcou o primeiro casal de animais da raça na cidade de Salvador (VIACAVA et al., 2000; SILVA; BOAVENTURA; FIORAVANTI, 2012). A partir de então, novos cruzamentos e acasalamentos com exemplares importados foram disseminados pelo território brasileiro. Atualmente, aproximadamente 80% do rebanho nacional é composto de animais de origem zebuína, sendo a raça Nelore a de maior representatividade em rebanhos destinados à produção de carne (ROSA; MENEZES, 2016).

De acordo com Rosa, Silva e Amaral (1997), o conhecimento da ancestralidade é uma prática antiga, de modo que o homem já controlava a genealogia de seus animais para a realização de acasalamentos endogâmicos e exogâmicos. Segundo os autores, com o passar das gerações e o aumento do número de criadores, o volume de informações de *pedigree* ficou complexo e, com isso, foram organizados os livros genealógicos denominados *herd books*. Atualmente a Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ) é responsável pelo registro das raças zebuínas no território nacional.

Diante da importância econômica da bovinocultura nacional, os produtores de bovinos de corte seguem aprimorando os sistemas produtivos e investindo em programas de melhoramento genético. Existem vários programas de melhoramento genético no Brasil que auxiliam o produtor na avaliação genética dos rebanhos, entre eles o Geneplus – Programa Embrapa de Melhoramento Genético de

Bovinos de Corte, o PMGZ – Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos desenvolvido pela ABCZ, e o Programa de melhoramento da ANCP – Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores. De acordo com o PMGZ (2022), no sumário do segundo semestre de 2022, foram publicadas avaliações genéticas para milhares de bovinos com aptidão para corte, entre as raças Brahman, Gir, Guzerá, Indubrasil, Nelore, Sindi e Tabapuã.

O melhoramento da produção animal pode ser realizado pelo melhoramento do ambiente, por meio de mudanças nos manejos nutricional, sanitário e reprodutivo, e pelo melhoramento genético, que pode ocorrer por meio de sistemas de acasalamento e da seleção de animais mais produtivos (ALENCAR, 2010). Nesse sentido, o melhoramento genético animal baseia-se na seleção dos indivíduos geneticamente superiores para serem os pais da próxima geração. A escolha dos animais e o acasalamento planejado têm como objetivo elevar a produção por meio do aumento da frequência dos genes favoráveis.

A seleção é um trabalho conduzido em conjunto por produtores e associações das raças, juntamente com programas de melhoramento genético. Os programas também podem dar suporte para a condução do controle zootécnico na propriedade através da correta coleta de dados, a fim de conhecer melhor o sistema de produção, promovendo o maior controle de todo o sistema produtivo.

Entretanto, antes de iniciar um programa de melhoramento, deve-se estabelecer os objetivos e os critérios de seleção. Segundo Alencar (2010), a escolha do objetivo de seleção deve considerar problemas de natureza econômica, no caso, características economicamente importantes que influenciam o sistema, sendo utilizada a genética para alcançar a melhoria desejada. Com relação ao critério de seleção, o mesmo autor explica que é o meio para atingir o objetivo, ou seja, é a escolha das características de importância econômica e associada com o objetivo. Características de herdabilidade e de variação fenotípica altas apresentam maior resposta à seleção; assim, o esforço para se obter determinado ganho é menor do que quando as características apresentam herdabilidade e variação fenotípica baixas (ALENCAR, 2010).

As informações coletadas no campo servem de insumo para a realização das avaliações genéticas, que tradicionalmente são realizadas com a combinação de informações de *pedigree* e fenótipo, resultando nas predições dos

valores genéticos. Os programas de avaliação genética estimam e apresentam em seus sumários as DEPs (Diferença Esperada na Progenie) para diversas características de interesse econômico, tais como de crescimento (peso ao nascer, à desmama, ao ano, ao sobreano, ganho de peso), reprodução (perímetro escrotal, idade ao primeiro parto, intervalo entre partos, *stayability* ou tempo de permanência no rebanho), morfológicas (escores visuais de conformação frigorífica, estrutura, precocidade, musculosidade), avaliações de ultrassonografia de carcaça (área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea, marmoreio) e de eficiência alimentar (consumo alimentar residual) (SUMÁRIO GENEPLUS, 2022; SUMÁRIO PMGZ, 2022).

2.2 AVALIAÇÃO GENÉTICA

O sucesso do melhoramento genético animal depende, essencialmente, da adoção de métodos de seleção, os quais demandam a predição dos valores genéticos dos animais candidatos à seleção (RESENDE; PEREZ, 1999). O mérito genético pode ser subdividido de acordo com os mecanismos de ação gênica, o qual diz respeito à seleção genética é a ação genética aditiva, isto é, o valor genético aditivo do animal (BERGMANN, 2008). O valor genético aditivo do animal também pode ser denominado de *breeding value*, valor gênico, valor reprodutivo e como DEP, comumente mencionada em sumários de bovinos de corte, ou *Predicted Transmitting Ability* (PTA), mais utilizada em bovinos leiteiros, que representam a metade do valor genético aditivo do indivíduo, devido o genitor transmitir apenas metade do seu material genético para a próxima geração.

Existem diferentes metodologias para estimar o valor genético dos animais considerando diferentes fontes de informações relacionadas ao indivíduo, tais como o seu próprio fenótipo, informações dos seus ancestrais e colaterais, além das informações dos descendentes do indivíduo. Com o desenvolvimento de novas tecnologias computacionais, foi possível a implementação de métodos estatísticos como a Máxima Verossimilhança Restrita (REML - *Restricted Maximum Likelihood*), para a estimação dos componentes de variância, e a metodologia Melhor Predição

Linear não Viesada (BLUP - *Best Linear Unbiased Prediction*), para a predição dos valores genéticos (CARNEIRO JUNIOR, 2009). A metodologia BLUP foi proposta por Henderson (1973) e consiste na predição dos valores genéticos ajustando-se os dados, concomitantemente, para os efeitos fixos e número desigual nas subclasses, por meio das Equações de Modelos Mistos (EMM), que é um algoritmo que possibilita primeiramente a obtenção dos componentes de variância a partir da metodologia REML e depois os valores genéticos pela metodologia BLUP (LOPES, 2005; CARNEIRO JUNIOR, 2009).

Lopes (2005) citou algumas vantagens da utilização da EMM para a obtenção do BLUP, como:

- a) Inclusão da informação completa por meio da matriz de parentesco;
- b) Comparação de indivíduos de diferentes níveis de efeitos fixos;
- c) Avaliação simultânea de reprodutores, fêmeas e progênies;
- d) Avaliação de indivíduos sem observações, com observações perdidas e com observações em apenas uma característica;
- e) Avaliação de características múltiplas;
- f) Avaliação de medidas repetidas.

Nesse sentido, Bergmann (2008) descreve as principais etapas para a realização da avaliação genética, na ordem:

- 1) Geração das informações nas propriedades e os seus envios para os programas de melhoramento genético;
- 2) Consistência dos dados e formação dos grupos de contemporâneos;
- 3) Formação dos arquivos para análises;
- 4) Cálculo do grau de parentesco entre todos os indivíduos;
- 5) Definição do modelo e a formação das respectivas equações simultâneas;
- 6) Produção dos resultados da avaliação genética (PTA, DEP, *breeding values*, entre outros).

Com relação aos modelos que podem ser elaborados na avaliação genética, existem três principais:

- a) Modelo Touro: cada touro possui a sua própria equação;

b) Modelo Animal: cada indivíduo da população apresenta sua própria equação,

c) Modelo Animal Reduzido: somente indivíduos com progênie dispõem de uma equação.

Bergmann (2008) relatou que entre os modelos citados acima e que são aplicáveis aos usos das EMM, os mais utilizados nas avaliações genéticas são o modelo touro e o modelo animal; entretanto, a definição de qual modelo utilizar para a estimação dos valores genéticos dependerá de fatores como objetivo do avaliador, do tipo e volume das informações a serem avaliadas e dos recursos computacionais.

Frequentemente os programas de melhoramento necessitam estimar os valores genéticos para todos os animais pertencentes ao rebanho, havendo ou não progênie ou fenótipos. Por isso, utiliza-se a metodologia do modelo animal.

Em notação matricial, as EMM para a obtenção dos BLUP sob o modelo animal é apresentada a seguir:

$$y = X\beta + Zg + e$$

em que:

y é o vetor de observações de características medidas nos indivíduos, com dimensão $n \times 1$;

X é a matriz de incidência de efeitos fixos, contendo somente valores 0 e 1, dos quais associam as observações dos indivíduos (y) aos efeitos fixos (β), com dimensão $n \times p$ (p refere-se aos níveis de efeitos fixos);

β é o vetor de efeitos fixos para os quais objetiva-se obter as soluções, com dimensão $p \times 1$;

Z é a matriz de incidência dos valores genéticos, contendo somente valores 0 e 1, dos quais associam as observações (y) aos valores genéticos dos indivíduos (g), com dimensão $n \times q$ (q refere-se ao número de indivíduos);

g é o vetor de valores genéticos (aleatórios), com dimensão $q \times 1$;

e é o vetor de efeitos ambientais não identificáveis ou de erros aleatórios, com

dimensão $n \times 1$.

Por este modelo, verifica-se que uma observação (y) em determinado animal pode ser desdobrada em termos de efeitos ambientais identificáveis (β), efeitos genéticos (g) e efeitos ambientais não identificáveis ou aleatórios (e) (RESENDE; PEREZ, 1999). Com isso, observa-se também que a predição do valor genético de cada indivíduo ocorre a partir dos fenótipos obtidos dos animais.

As EMM baseadas no modelo animal para a predição dos valores genéticos dos animais e as soluções para os efeitos fixos são dadas por:

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z \\ Z'R^{-1}X & Z'R^{-1}Z+G^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta \\ \hat{g} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}y \\ Z'R^{-1}y \end{bmatrix}$$

em que

$G = A \otimes G_0$, sendo:

A : uma matriz que indica o grau de parentesco entre os indivíduos, e

G_0 : uma matriz de variância e covariância genética aditiva entre as características;

$R = I \otimes R_0$, sendo:

I : uma matriz identidade, e

R_0 : uma matriz de variância e covariância residual entre as características;

\otimes operador produto direto.

As soluções para β e \hat{g} são realizadas por:

$$\beta = \left[X'R^{-1}X - X'R^{-1}Z(Z'R^{-1}Z+G^{-1})^{-1}Z'R^{-1}X \right]^{-1} \left[X'R^{-1}y - X'R^{-1}Z(Z'R^{-1}Z+G^{-1})^{-1}Z'R^{-1}y \right]$$

$$\hat{g} = (Z'R^{-1}Z+G^{-1})^{-1}Z'R^{-1}(y-X\beta)$$

Um ponto importante na estimação do valor genético do animal é o conhecimento da relação genética entre os indivíduos. A probabilidade de genes idênticos por descendência ocorrerem em dois indivíduos é denominada coancestria ou coeficiente de parentesco (FALCONER; MACKAY, 1996).

A matriz que indica a relação genética aditiva entre os indivíduos é chamada de matriz de relacionamento ou de parentesco. A matriz de parentesco (A) é essencial na avaliação genética pelo BLUP, permitindo a obtenção de resultados mais acurados (pela consideração das informações de parentes) e não viciados (pela consideração da correlação entre os valores genéticos, na estimação dos efeitos fixos) (RESENDE; PEREZ, 1999).

Henderson (1976) descreveu as propriedades da matriz A, sendo (i) é simétrica; (ii) o elemento diagonal para o animal i (a_{ii}) é igual a $1 + F_i$, onde F_i é o coeficiente de endogamia do animal i (Wright, 1922). O elemento diagonal representa duas vezes a probabilidade de que dois gametas retirados ao acaso do animal i carreguem alelos idênticos por descendência (MRODE; THOMPSON, 2005), (iii) o elemento fora da diagonal, a_{ij} , é igual ao numerador do coeficiente de consanguinidade (Wright, 1922) entre os animais i e j .

O coeficiente de consanguinidade estima a quantidade esperada da redução em heterozigose, como função do ascendente comum dos pais, e é a probabilidade de que dois alelos, em qualquer *loci*, em um indivíduo sejam idênticos por origem (LOPES, 2005). A fórmula para calcular o coeficiente de consanguinidade foi apresentada por Wright (1922), sendo ela:

$$F_x = \sum \left[\left(\frac{1}{2} \right)^{n_1+n_2+1} (1+F_A) \right]$$

em que

F_x é o coeficiente de consanguinidade do indivíduo;

n_1 é o número de gerações, partindo-se de um dos pais, até o ancestral comum;

n_2 é o número de gerações, partindo-se do outro pai, até o ancestral comum;

F_A coeficiente de consanguinidade do ancestral comum;

Σ é o somatório de todos os ancestrais comuns.

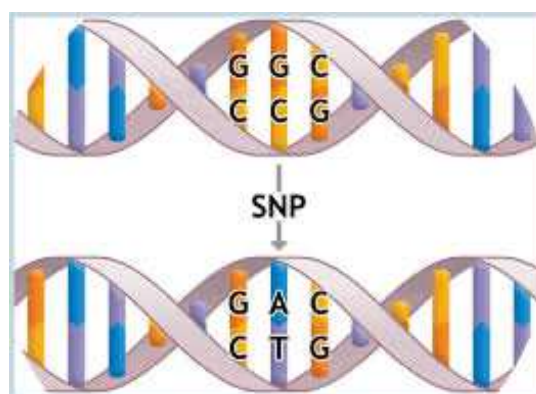
Quando multiplicado pela variância genética aditiva (σ_a^2), $A\sigma_a^2$, descreve a estrutura de variância-covariância entre valores genéticos aditivos dos animais (a) (KENNEDY; SCHAEFFER; SORENSEN, 1988).

2.3 MARCADORES MOLECULARES DO TIPO SNP

Marcadores genéticos são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997). Esses marcadores podem ser divididos em dois grupos básicos: marcadores morfológicos, que são utilizados para a identificação dos genótipos desde os tempos de Mendel; e marcadores moleculares, que viabilizam a caracterização genética de muitos genótipos, por exemplo, marcadores moleculares enzimáticos e de DNA (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997).

Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs - do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) são marcadores moleculares do DNA que estão amplamente distribuídos no genoma e estão presentes em regiões codificadoras (*éxons*) e não codificadoras (*íntrons* e regiões intergênicas), originando-se de mutações pontuais no DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) e Guanina (G)) (Figura 1). As mutações podem ser derivadas de eventos de transições e transversões, sendo as transições as mais comuns e que ocorrem entre trocas de bases purínicas (A/G) ou entre bases pirimidínicas (C/T). Já as transversões ocorrem quando existe a troca entre bases purínicas por pirimidínicas (A/T, G/C, T/A e C/G) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Figura 1 – Exemplificação de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)



Fonte: Society for Mucosal Immunology (2014).

Os marcadores do tipo SNP são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontradas apenas duas variantes em uma espécie, no qual um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C (CAETANO, 2009), sendo considerado menos informativos por *locus* examinado quando comparados a outros marcadores, como os microssatélites (SSRs – do inglês *Simple Sequence Repeats*) (KAHL et al., 2005; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

A densidade de SNPs pode variar substancialmente entre diferentes regiões de um genoma e entre diferentes espécies e, como limite, o alelo menos frequente deve ter uma abundância de 1% (ou mais) (KAHL et al., 2005).

A utilização de marcadores moleculares SNP em estudos de associação e mapeamento genético, assim como em ensaios diagnósticos para confirmação de paternidade, identificação individual, detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados a características de produção, esteve limitada por muito tempo devido às restrições tecnológicas (MILLER, 2010).

O desenvolvimento de plataformas de genotipagem de marcadores do tipo SNPs em alta densidade ao longo de todo genoma foi direcionado para a utilização na produção animal, especialmente para a bovinocultura, impulsionado por pesquisas relacionadas ao genoma bovino (ELSIK et al., 2009).

A seleção genômica tem o objetivo de utilizar os SNPs como ferramentas auxiliares na predição de valores genéticos mais acurados, contribuindo para um processo de seleção mais eficaz. O Estudo de Associação Genômica Ampla

(GWAS) objetiva identificar SNPs associados com características de interesse e explorar as regiões do genoma em que esses SNPs estão inseridos, buscando genes e/ou *loci* relacionadas à expressão fenotípica das características de interesse (UTSUNOMIYA et al., 2013).

As características de interesse econômico, em sua maioria, são resultantes da ação de diversos genes de grande e/ou de pequenos efeitos individuais, acrescidos da influência de fatores ambientais. A identificação e associação desses alelos com as características foi possível graças ao desenvolvimento de técnicas relacionadas aos marcadores moleculares.

As regiões genômicas que influenciam as características fenotípicas são denominadas *Quantitative Trait Loci* (QTL), sendo a seleção para QTLs possível por meio de um teste para uma mutação causal em um gene, conhecida por Seleção Assistida por Genes (GAS), ou em um marcador genético em ligação com o QTL, denominada por Seleção Assistida por Marcadores (MAS) (MILLER, 2010).

Alelos fisicamente próximos em um cromossomo são herdados de maneira interconectada, transmitidos pelos progenitores na forma de blocos de alelos ou haplótipos; isso resulta em um nível de correlação entre os alelos, denominado de desequilíbrio de ligação (O'BRIEN et al., 2014). Assim, o desequilíbrio de ligação ocorre quando dois *loci* estão suficientemente próximos no genoma, de modo que a recombinação durante a meiose entre eles é rara e segmentos do cromossomo são conservados de pai para filho; por isso, a seleção pelo marcador vinculado resulta em uma resposta correlacionada na característica de interesse (MILLER, 2010).

Existem no mercado diferentes tecnologias e empresas que realizam a genotipagem dos SNPs, variando a tecnologia aplicada, bem como os custos, vantagens e desvantagens. No entanto, o ponto em comum entre qualquer uma dessas plataformas é que os ensaios para SNPs específicos podem ser adaptados para todas as tecnologias, permitindo que a mesma informação genotípica possa ser acessada, independentemente da tecnologia utilizada (CAETANO, 2009).

Há variados chips ou painéis disponíveis no mercado para a genotipagem de diferentes espécies como bovinos, suínos, ovinos, peixes, camundongos e equinos. Na produção animal, é possível encontrar painéis prontos para a comercialização e que podem variar a densidade entre baixa

(aproximadamente 8K [oito mil] marcadores), média (aproximadamente 50K marcadores) e alta densidade (aproximadamente 777K marcadores) para bovinos, por exemplo, além, da possibilidade de confeccionar painéis contendo determinado número de marcadores de acordo com a demanda do solicitante.

2.3.1 Marcadores Moleculares para Teste de Paternidade

Os produtores e associações, juntamente com programas de melhoramento genético, realizam o controle zootécnico da propriedade através da coleta de dados a fim de conhecer o sistema de produção, promovendo o controle e identificando situações em que é possível melhorá-lo. Segundo Lôbo (2011), a escrituração zootécnica pode ser dividida no sentido amplo, que se trata do mecanismo de descrição formal de toda a estrutura da propriedade, e no sentido restrito, que consiste em anotações de controle do rebanho, com fichas individuais por animal, registrando-se sua genealogia, ocorrências ao longo da vida e seu desempenho. Nesse sentido, realizar o controle zootécnico eficiente não permite apenas conhecer o número de identificação de cada animal, mas sim toda a sua genealogia e fenótipo ao longo da vida.

A partir do momento que as informações de desempenho são conhecidas, é possível avaliar e controlar de forma assertiva quais indivíduos estão aptos para reprodução, apresentam maior grau de parentesco, maior ganho de peso, longevidade, entre outras características importantes para o sucesso do sistema de produção. A avaliação correta das relações entre os indivíduos de uma população é um dos principais requisitos para um programa de melhoramento genético bem-sucedido (TALENTI et al., 2016). Entretanto, erros no registro genealógico podem acarretar estimativas de valores genéticos viesadas e declinar a qualidade da avaliação genética.

Dois tipos de erros de *pedigree* podem influenciar os resultados da estimativa do valor genético: informações de linhagem incorretas (parentesco incorreto) e informações de linhagem ausentes (parentesco desconhecido) (HARDER et al., 2005).

Uma das consequências de informações incompletas de *pedigree* é a

subestimação da consanguinidade (HARDER et al., 2005). Ao estudar o impacto dos erros de identificação de paternidade nas avaliações genéticas de touros da raça Holandesa, Banos, Wiggans e Powell (2001), verificaram que uma taxa de 11% de erro no *pedigree* reduziu em 7 a 11% a consanguinidade média estimada de todos os animais, além disso, as tendências genéticas anuais estimadas diminuíram em 11 a 15% no geral. Já em gado de corte, Nwogwugwu et al. (2020) observaram que o aumento na taxa de erro no *pedigree* determina redução da acurácia da predição dos valores genéticos, do ganho genético e da herdabilidade de características relacionadas com a qualidade de carcaça, impactando nas respostas de seleção em um programa de melhoramento.

Uma das vantagens do uso de marcadores moleculares e das ferramentas genômicas é o auxílio na correção das informações de parentesco, além de melhorar a acurácia das predições das avaliações para características de interesse econômico. O uso de marcadores moleculares para determinação da paternidade já foi explorado na produção animal (VISSCHER et al., 2002; HAYES et al., 2009; HEATON et al., 2014; TALENTI et al., 2016).

No Brasil, a inscrição de reprodutores de várias espécies, incluindo a bovina, em centros de coleta e processamento de sêmen está condicionada a diversas exigências, entre elas a apresentação do Certificado de Registro Genealógico Definitivo ou de Controle de Genealogia Definitivo do animal, emitido pela associação de criadores da raça, além da comprovação do parentesco com seus genitores, por meio da genotipagem de DNA (BRASIL, 2020). Na Instrução Normativa nº 45 de 2017 (BRASIL, 2017), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamenta que a identificação genética animal deve ser obrigatoriamente realizada pela análise das regiões polimórficas do DNA (locos microssatélites) ou pelo teste de polimorfismos de nucleotídeos único, descritas para as diferentes espécies animais e validadas internacionalmente pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG).

Os marcadores genéticos do tipo microssatélites foram os mais utilizados durante décadas para o teste de parentesco (FERNÁNDEZ et al., 2013). Segundo Vignal et al. (2002), os resultados obtidos com marcadores microssatélites por diferentes laboratórios nem sempre são comparáveis, além disso, o tempo investido para análise dos dados é maior comparado com a de marcadores do tipo SNP, por exemplo, mesmo com o uso de *softwares* específicos ou outros

métodos automatizados para análise de alelos.

A análise de parentesco baseada em informação do DNA está mudando do uso de marcadores do tipo microssatélites para marcadores do tipo SNP (TALENTI et al., 2016), proporcionando maior exatidão na determinação da paternidade dos animais na pecuária (HEATON et al., 2014). Ademais, os SNPs não são usados exclusivamente para verificação de parentesco, eles também podem ser usados na seleção genômica (MEUWISSEN; HAYES; GODDARD, 2001) como uma fonte adicional de informação em programas de melhoramento genético em diferentes espécies (GARCÍA-RUIZ; WIGGANS; RUIZ-LÓPEZ, 2019).

Em 2012 foram publicadas diretrizes para a verificação de parentesco de bovinos baseadas em marcadores do tipo SNP (ISAG, 2012). Inicialmente foi recomendado um conjunto de 100 SNPs validados em raças taurinas (painel ISAG *Core*). Posteriormente foi adicionado um conjunto de 100 marcadores para aumentar o poder de exclusão em raças zebuínas (painel ISAG *additional*). De acordo com o ISAG (2013), os 100 marcadores extras foram selecionados a partir de painéis baixa densidade, alta densidade e 50K da Illumina, atendendo aos critérios de menor frequência alélica média de 0,4 e uma distância mínima de 10cM em todos os cromossomos, obtendo-se bom desempenho em raças taurinas e sendo validados para raças zebuínas e raças compostas. No total, 23 raças foram avaliadas para a validação do painel para teste de parentesco em bovinos, são elas:

- | | | |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1. Brangus | 9. Bazadaise | 17. Normande |
| 2. Brahman | 10. Bretonne Pie Noire | 18. Vosgienne |
| 3. Braford | 11. Tarentaise | 19. Rouge Flamande |
| 4. Abondance | 12. Limousine | 20. Holstein |
| 5. Aubrac | 13. Simmental Française | 21. Parthenaise |
| 6. Pie Rouge Des Plaines | 14. Charolaise | 22. Gasconne |
| 7. Brown | 15. Rouge Des Prés | 23. Blonde d'Aquitaine |
| 8. Salers | 16. Montbeliarde | |

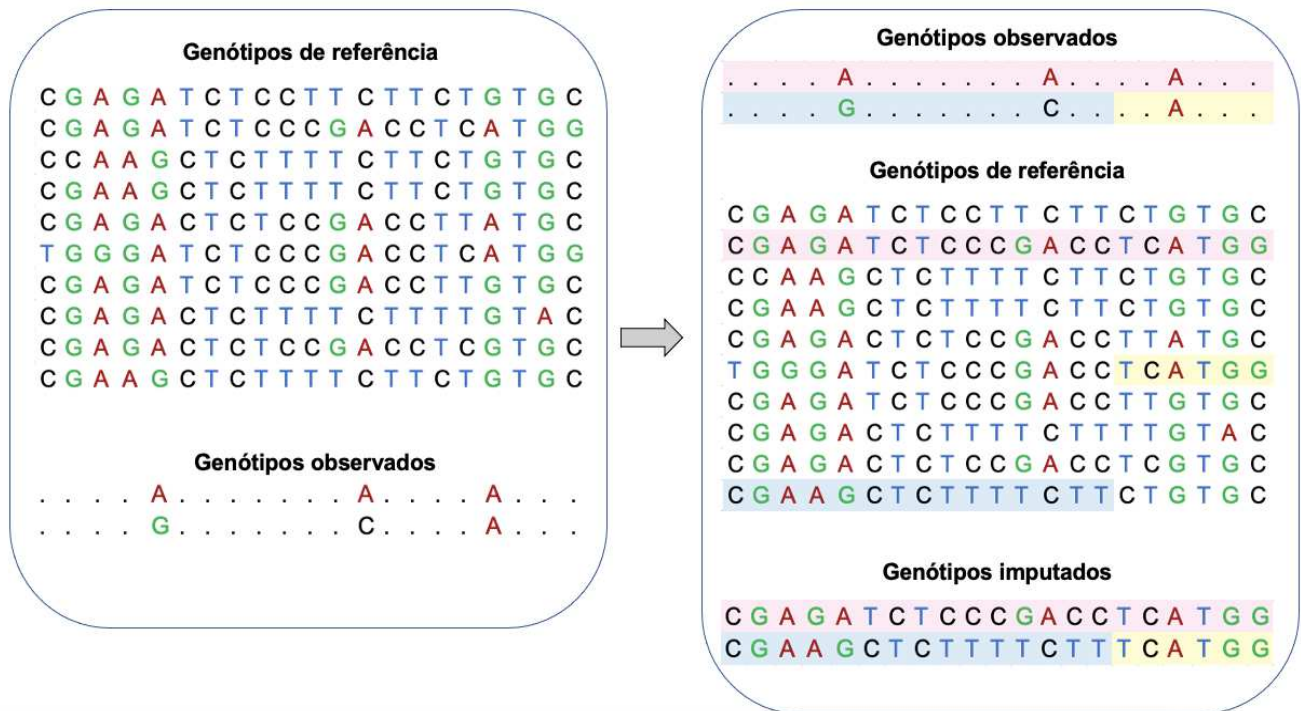
O uso de marcadores moleculares para análise de parentesco levou ao desenvolvimento de várias análises estatísticas e *softwares* destinados a verificação de parentesco. Entre as análises, as principais são baseadas na exclusão, alocação categórica, alocação fracionada, probabilidade total, reconstrução parental e reconstrução de irmãos (JONES et al., 2010). De acordo com Sanarana et al. (2021), para estabelecer painéis de marcadores baseados em SNP, é essencial que os marcadores escolhidos sejam informativos em várias populações bovinas, partindo do princípio de que o método de seleção ocorre de maneira não aleatória, em que selecionam-se alelos que estão segregando em altas frequências nas raças taurinas e zebuínas.

2.4 IMPUTAÇÃO DE GENÓTIPOS

A imputação de genótipos se destaca por permitir prever genótipos de marcadores faltantes em uma amostra com base em haplótipos presentes na população ou em indivíduos aparentados (LI et al., 2009). Com o uso desta técnica, é possível genotipar animais com painéis de baixa densidade e prever os genótipos do painel de alta densidade (MILLER, 2010; KHATKAR et al., 2012), desde que haja sobreposição suficiente entre os painéis (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014).

De acordo com Liu et al. (2019), a imputação pode ser realizada com base na informação da população ou na informação do *pedigree*, sendo a primeira realizada utilizando o desequilíbrio de ligação entre os marcadores SNP observados na população utilizada como referência, enquanto a segunda utiliza as regras de ligação e segregação mendeliana para prever os genótipos, sendo mais acurada para indivíduos que possuem parentes genotipados. Na Figura 2 observa-se o exemplo de imputação utilizando uma população referência, em que foi genotipada com painel de maior densidade quando comparada à amostra genotipada com painel de baixa densidade, sendo possível realizar a predição dos marcadores ausentes.

Figura 2 – Exemplificação da imputação de genótipos em uma amostra de indivíduos não aparentados



Fonte: Adaptado de Li et al. (2009).

Segundo Chud et al. (2015), os painéis de marcadores moleculares do tipo SNP de diferentes densidades são amplamente utilizados em estudos genômicos, sendo comum para a redução de custos a utilização dos painéis de baixa densidade na genotipagem dos animais, podendo-se posteriormente realizar a imputação para prever os genótipos ausentes.

Uma das estratégias de utilização de painéis de baixa densidade é a genotipagem de fêmeas ou animais jovens com chips contendo número reduzido de marcadores e, posteriormente, a imputação para painéis de maior densidade e mais informativos, como os de 50K marcadores. A imputação possui a grande vantagem na redução dos custos da genotipagem por indivíduo, além do aumento da acurácia de seleção (MILLER, 2010; HAYES et al., 2011).

Em bovinos de corte, a imputação é aplicável na realização da genotipagem de todos os touros com o painel de alta densidade e, em seguida, as progênes têm seus genótipos de HD imputados a partir de um painel de menor densidade e mais econômico (MILLER, 2010). Hayes et al. (2011) descreveram que,

entre os métodos disponíveis de imputação, existem aqueles que se baseiam no uso do parentesco conhecido entre os indivíduos e aqueles que dependem do desequilíbrio de ligação entre os SNPs em uma população sem relações conhecidas.

Estudos envolvendo imputação com populações reais e/ou simuladas demonstraram que é possível obter resultados satisfatórios com previsões genômicas confiáveis (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2010; MULDER et al., 2012; PICCOLI et al., 2014; SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014; MOGHADDAR et al., 2015; BOLORMAA et al., 2019; LIU et al., 2019).

Para algumas populações de animais, os SNPs ausentes não podem ser inferidos com alta precisão, pois isso depende da estrutura da população de referência (isto é, do grupo de animais genotipados com SNPs de alta densidade) e da densidade de marcadores das populações de referência e imputadas (VENTURA et al., 2016).

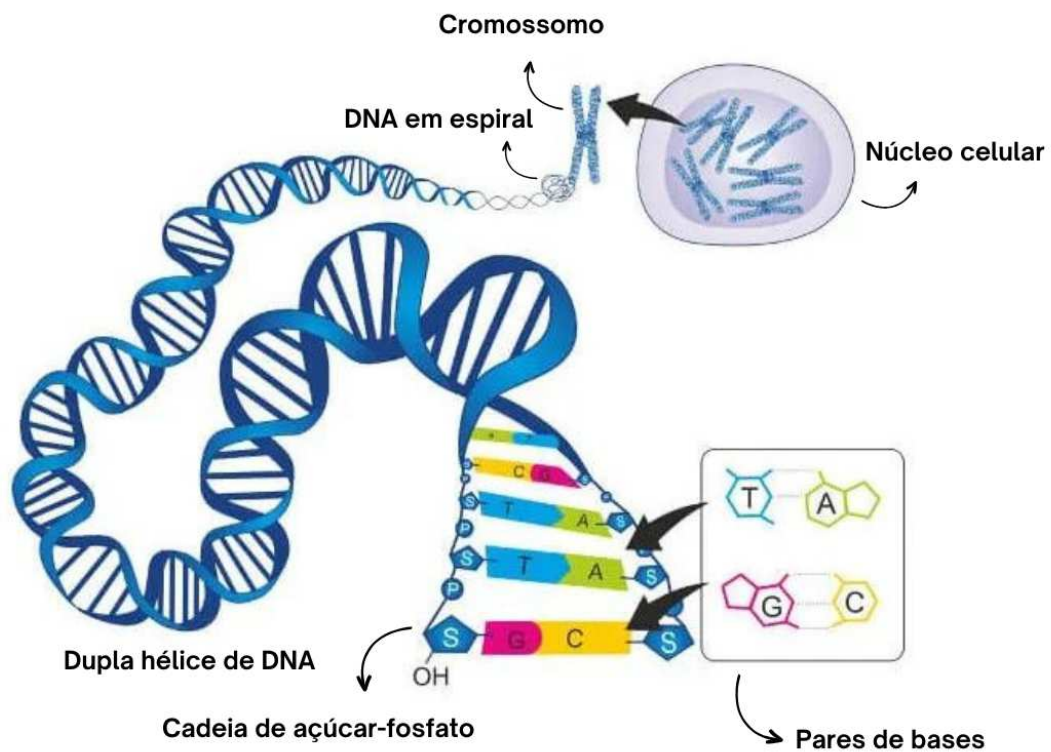
O grau de confiabilidade da imputação é verificado através da acurácia. A acurácia de imputação pode ser medida de acordo com a quantidade de genótipos imputados corretamente, e este resultado dependerá do grau de parentesco entre a população de imputação e a população de referência, além da quantidade de marcadores e de indivíduos na população de referência (KHATKAR et al., 2012; MARCIANO et al., 2018).

2.5 AVALIAÇÃO GENÉTICA GENÔMICA

A genômica é a área da ciência cujo objetivo é estudar o genoma, ocupando-se de aprofundamentos relacionados à interação entre os genes e o meio ambiente, o sequenciamento, a estrutura, mapeamentos, marcadores moleculares, entre outras avaliações derivadas do material genético de um organismo. Compreende-se por genoma o conjunto completo de material genético de um organismo, ou seja, a sequência completa das moléculas do DNA (ácido desoxirribonucleico), que contêm toda a informação genética do ser vivo e está presente dentro das células. O DNA apresenta a forma de dupla hélice, composto por três partes, uma pentose, um grupo fosfato e uma das seguintes bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), timina (T) e guanina (G). As sequências de centenas ou

milhares de pares de bases nitrogenadas (A-T ou C-G) formam os genes, os quais são unidades de informação hereditária que formam os cromossomos (Figura 3). Estes determinam a expressão das características próprias da espécie e do indivíduo, especificando as sequências de aminoácidos que servem de base para a síntese de proteínas.

Figura 3 – Estrutura do DNA



Fonte: Adaptado de Santos (2023).

Segundo o estudo de Elsik et al. (2009), o genoma bovino apresenta o tamanho estimado de aproximadamente 2,87 bilhões de unidades de informação ou pares de nucleotídeos no DNA e pelo menos 22 mil genes codificadores de proteínas. Em razão dos avanços nas técnicas de biologia molecular e das pesquisas relacionadas com o sequenciamento do genoma bovino, o surgimento de novas ferramentas permitiu adaptações nas metodologias para predição dos valores genéticos dos animais. Isso possibilitou a identificação precoce de indivíduos de alto valor genético, principalmente para características de interesse econômico expressas

tardamente e/ou de difícil mensuração, como as características de carcaça e eficiência alimentar, ou relacionadas à qualidade de carne, por exemplo.

A seleção genômica proposta por Meuwissen, Hayes e Goddard (2001) caracteriza-se por uma seleção simultânea de muitos marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma de maneira densa. Assim, utiliza-se os efeitos dos marcadores estimados em uma população de referência, que possui genótipos e fenótipos, para prever os valores genéticos de candidatos à seleção apenas com base nos seus genótipos.

As relações genômicas podem estimar melhor a proporção de segmentos de cromossomos compartilhados por indivíduos, pois a genotipagem de alta densidade identifica genes idênticos que podem ser compartilhados por ancestrais comuns não registrados no heredograma (FORNI; AGUILAR; MISZTAL, 2011). Nesse sentido, algumas das vantagens do uso de marcadores moleculares e das ferramentas genômicas incluem as avaliações baseadas em genótipos, utilizando marcadores do tipo SNP, podendo ser computadas assim que o DNA esteja disponível para análise, o que permite a seleção em ambos os sexos logo no início da vida (VANRADEN, 2008), além do auxílio na correção das informações de parentesco e aumento da acurácia das predições das avaliações para características de interesse econômico.

As etapas envolvidas na obtenção de predições genômicas por meio de matrizes de marcadores e informações de fenótipos foram descritas por VanRaden (2008), Legarra, Aguilar e Misztal (2009) e Misztal, Aggrey e Muir (2013), os quais incluem primeiramente a avaliação tradicional do BLUP baseado em *pedigree*, seguido da extração de pseudo-fenótipos (fenótipos ajustados para efeitos fixos, valor genético estimado, valor genético estimado desregredido, por exemplo). Posteriormente, estima-se os efeitos dos SNPs em uma população de referência e, por último, realiza-se as predições dos valores genéticos genômicos (GEBV).

O modelo básico para se estimar simultaneamente os efeitos dos marcadores SNPs e os valores genéticos genômicos foi descrito por Meuwissen, Hayes e Goddard (2001) como:

$$y_i = \mu 1_n + \sum_i X_i g_i + e_i$$

em que

y_i é um vetor de fenótipos do animal;

μ é a média geral;

1_n é um vetor de n uns;

\sum_i é o somatório de efeitos de g_i ;

X_i é a matriz que relaciona g_i ao fenótipo observado do animal;

g_i é um vetor de efeitos genéticos aditivos ou de valores genéticos diretos derivados dos genótipos;

e_i é um vetor de resíduos.

Existem diferentes metodologias estatísticas para estimar os efeitos dos marcadores na seleção genômica, que podem ser aplicadas de acordo com a necessidade do estudo a ser realizado e a arquitetura do banco de dados. Resende et al. (2012) classificaram os principais métodos para estimar os efeitos dos marcadores na seleção genômica ampla em três classes: I) regressão explícita - métodos: *Random Regression BLUP* (RR-BLUP), *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator* (LASSO), BayesA, BayesB, entre outros; II) regressão implícita – métodos: Regressão Kernel, redes neurais, entre outros e III) regressão com redução dimensional – métodos: componentes principais, quadrados mínimos parciais, entre outros.

A realização de múltiplas etapas para a avaliação genômica (*multi-step*) é complexa e propensa a erros, pois implica em várias aproximações, muitos parâmetros e suposições, podendo reduzir a acurácia e inflar o valor genético genômico estimado (AGUILAR et al., 2010; MISZTAL; AGGREY; MUIR, 2013). Uma metodologia mais simples e de única etapa, o GBLUP de etapa única, ou também denominado de ssGBLUP, integra a matriz de relações derivadas genomicamente (G) com a matriz de relações de linhagem baseadas na população (A) em uma matriz de relação combinada (H) e permite a seleção genômica em uma única etapa (MISZTAL; AGGREY; MUIR, 2013).

A matriz de relacionamento genômico permite ser calculada por diferentes métodos (VANRADEN, 2008) e quando combinada à matriz A, resulta na matriz H desenvolvida por Legarra, Aguilar e Misztal (2009), articulando informações de *pedigree* e relações genômicas simultaneamente, da seguinte forma:

$$H = A + \begin{bmatrix} A_{12}A_{22}^{-1} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I \\ I \end{bmatrix} [G - A_{22}] \begin{bmatrix} I & \\ & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{22}^{-1}A_{21} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix}$$

em que

A é a matriz de parentesco baseada em *pedigree*;

I é uma matriz identidade, os subscritos 1 correspondem os animais não genotipados e o subscrito 2 correspondem aos animais genotipados;

G é a matriz de relacionamento genômico.

No modelo animal, o inverso da matriz A (A^{-1}) é substituída pela matriz inversa da H (H^{-1}):

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

em que

G^{-1} é o inverso da matriz de relacionamento genômico;

A^{-1} é o inverso da matriz de parentesco baseadas em *pedigree*;

A_{22}^{-1} é o inverso da matriz de parentesco baseada em *pedigree* para os animais genotipados.

2.6 AVALIAÇÃO GENÉTICA DE EMBRIÕES BIOPSIADOS

Entre as biotecnologias disponíveis e aplicáveis no melhoramento genético de bovinos, a produção de embriões *in vitro* vem ganhando destaque no cenário nacional. Segundo Gonçalves e Viana et al. (2019), o ano de 2019 marcou os 20 anos dos primeiros registros de transferências de embriões bovinos produzidos *in vitro* por empresas comerciais no Brasil. Os autores também ressaltaram que o emprego em larga escala das tecnologias de embriões impactou positivamente os programas de melhoramento e, conseqüentemente, a evolução genética dos rebanhos de corte e leite.

Em 2017, a produção de embriões *in vitro* em bovinos no Brasil foi de 96.184 para zebuínos de corte e 68.869 para taurinos de corte (GONÇALVES e VIANA, 2019). Diante da utilização crescente dessa técnica, acredita-se que os investimentos em fertilização *in vitro* poderiam ser otimizados se o mérito genético dos embriões pudesse ser previsto com maior confiabilidade.

Coutinho et al. (2010) explicaram que a possibilidade de se determinar o potencial genético de um animal nos estágios embrionários ou quando jovens, sem a necessidade de avaliação da produção ou da progênie, levaria a uma seleção mais rápida e eficiente de animais superiores. Nessa perspectiva, Mullaart e Wells (2018) enfatizaram que a seleção, utilizando informações genômicas, pode ser realizada ainda no embrião, na fase pré-implantação, sendo possível escolher apenas os melhores indivíduos do sexo e com genótipo desejável, eliminando aqueles portadores de problemas genéticos.

A genotipagem no momento da formação do blastocisto para embriões produzidos *in vitro* permite o cálculo dos valores genômicos para embriões individualmente e, portanto, a seleção daqueles com os maiores valores genéticos (LAURI et al., 2013). Além disso, a produção *in vitro* permite a produção de grandes quantidades de embriões, aumentando a intensidade da seleção rapidamente e levando a um rápido melhoramento genético (SOUSA et al., 2017).

De acordo com Saadi et al. (2014), a biópsia do embrião é rotineiramente realizada para várias aplicações, como sexagem, detecção de defeitos de um único gene e cor da pelagem. A biópsia de um embrião contém em torno de 10 a 15 células, sendo a quantidade de DNA obtida de aproximadamente 60 a 90 pg

(picogramas), o que é insuficiente para a genotipagem de SNP, fazendo-se necessária a tecnologia de amplificação completa do genoma para aumentar o teor de DNA inicial antes da genotipagem de SNP (SAADI et al., 2014; FUJII et al., 2019).

Existem diversas técnicas de amplificação do genoma completo. Entre elas pode-se citar a baseada em PCR (ciclo térmico) (MOGHADDASZADEH-AHRABI et al., 2012) e não baseada em PCR (amplificação isotérmica) (HUGHES et al., 2005). De acordo com Coutinho et al. (2010), a técnica de PCR consiste em uma amplificação ou multiplicação exponencial de regiões específicas no DNA, a partir de uma quantidade mínima de material genético.

Segundo Coutinho et al. (2010), a PCR vem sendo empregada no sequenciamento de DNA, teste de paternidade, seleção genética, detecção de defeitos genéticos, diagnóstico do câncer, estudos forenses e identificação de organismos patogênicos em processos infecciosos ou contaminações, por exemplo.

Entretanto, para a execução da análise genética a partir de amostras extremamente pequenas de DNA, como oócitos em desenvolvimento e regiões selecionadas obtidas por microdissecção a laser, torna-se necessário a realização da amplificação total do genoma (SABINA e LEAMON, 2015). O processo de amplificação geralmente leva à redução da cobertura do genoma, o que, por sua vez, resulta em alguns erros de genotipagem, como a perda de um alelo nos locos heterozigotos (LAURI et al, 2013). Com a ocorrência de erros, a predição genômica e a viabilidade de se realizar a seleção genômica podem ser comprometidas.

Visando amenizar parte dos erros de genotipagem, Saadi et al. (2014) sugeriram como alternativa genotipar os genitores dos embriões e usar essas informações para corrigir inconsistências, seguidas de imputação para prever genótipos ausentes. Assim, torna-se possível realizar a predição do valor genético dos embriões e dar continuidade às etapas necessárias para a seleção dos animais.

3 REFERÊNCIAS

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, p. 743-752, 2010.

ALENCAR, M. M. Critérios de seleção em bovinos de corte. *In*: CURSO DE MELHORAMENTO DE GADO DE CORTE - GENEPLUS, 22., 2010, Campo Grande, MS. **Anais** [...]. Campo Grande: GENEPLUS, 2002. p. 1-12. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/871328>. Acesso em: 20 jan 2022.

BANOS, G.; WIGGANS, G. R.; POWELL, R. L. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2523–2529, 2001.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BERGMANN, J. A. G. Avaliação Genética. *In*: PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, p. 205-257, 2008.

BOLORMAA, S.; CHAMBERLAIN, A. J.; KHANSEFID, M.; STOTHARD, P.; SWAN, A. A.; MASON, B.; PROWSE-WILKINS, C. P.; DUIJVESTIJN, N.; MOGHADDAR, N.; WERF, J. H. V. D.; DAETWYLER, H. D.; MACLEOD, I. M. Accuracy of imputation to whole-genome sequence in sheep. **Genetics Selection Evolution**, v. 51, p.1-17, 2019.

BOLORMAA, S.; PRYCE, J. E.; KEMPER, K.; SAVIN, K.; HAYES, B. J.; BARENDSE, W.; ZHANG, Y.; REICH, C. M.; MASON, B. A.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B.E.; REVERTER, A.; HERD, R. M.; TIER, B.; GRASER, H. U.; GODDARD, M. E. Accuracy of prediction of genomic breeding values for residual feed intake and carcass

and meat quality in *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3088-3104, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 45 de 15 de dezembro de 2017**. Aprova os critérios e requisitos específicos para o credenciamento de laboratórios que realizam testes de identificação genética e verificação de parentesco de animais pela análise do DNA. Brasília, 26 dezembro de 2017. Seção 1, p. 3-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13 de 3 de março de 2020**. Estabelece as regras e os procedimentos para a avaliação zoogenética, requisito necessário para a inscrição de reprodutores das espécies bovina, bubalina, ovina e caprina em centros de coleta e processamento de sêmen. Brasília, 5 de março de 2020. Seção 1, p. 2.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 64-71, 2009.

CARNEIRO JUNIOR, J. M. Melhoramento genético animal. *In*: GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. (org.). **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2009, p. 197-208.

CHUD, T. C. S.; VENTURA, R. V.; SCHENKEL, F. S.; CARVALHEIRO, R.; BUZANSKAS, M. E.; ROSA, J. O.; MUDADU, M. A.; SILVA, M. V. G. B.; MOKRY, F. B.; MARCONDES, C. R.; REGITANO, L. C. A.; MUNARI, D. P. Strategies for genotype imputation in composite beef cattle. **BMC Genetics**, v. 16, p. 1-10, 2015.

COUTINHO, L. L.; JORGE, E. C.; ROSÁRIO, M. F.; REGITANO, L. C. A. A genômica na bovinocultura de corte. *In*: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovino cultura de corte**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2010, p. 813-823.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C., et al. The Genome Sequence of

Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. **Science**, v. 324, p. 522-528, 2009.

FALCONER D. S.; MACKAY T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4th ed. Pearson Longman, Harlow, UK, 1996.

FERNÁNDEZ, M. E.; GOSZCZYNSKI, D. E.; LIRÓN, J. P.; VILLEGAS-CASTAGNASSO, E. E.; CARINO, M. H.; RIPOLI, M. V.; ROGBERG-MUÑOZ, A.; POSIK, D. M.; PERAL-GARCIA, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 185–191, 2013.

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.

GARCÍA-RUIZ, A.; WIGGANS, G. R.; RUIZ-LÓPEZ, F. J. Pedigree verification and parentage assignment using genomic information in the Mexican Holstein population. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1806–1810, 2019.

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 156-159, 2019.

HARDER, B.; BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; MAYER, M.; KALM, E. Effect of missing sire information on genetic evaluation. **Archives Animal Breeding**, v. 48, n. 3, p. 219–232, 2005.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. C.; VERBYLA, K.; GODDARD, M. E. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, n. 1, p. 51, 2009.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; DAETWYLER, H. D.; KIJAS, J. W.; WERF, J. H.

J. Accuracy of genotype imputation in sheep breeds. **Animal Genetics**, v. 43, n. 1, p. 72–80, 2011.

HEATON M. P.; LEYMASTER, K. A.; KALBFLEISCH, T. S.; KIJAS, J. W.; CLARKE, S. M.; MCEWAN, J.; MADDOX, J. F.; BASNAYAKE, V.; PETRIK, D. T.; SIMPSON, B.; SMITH, T. P.; CHITKO-MCKOWN, C. G. SNPs for parentage testing and traceability in globally diverse breeds of sheep. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2014.

HENDERSON, C. R. A Simple Method for Computing the Inverse of a Numerator Relationship Matrix Used in Prediction of Breeding Values. **Biometrics**, v. 32, n. 1, p. 69–83, 1976.

HENDERSON, C. R. Sire evaluation and genetic trends. In: Symposium Animal Breeding and Genetic, 1973, Champaign. **Proceedings** [...] Champaign, ASAS: ADSA, 1973, p. 10-41.

ISAG. **Guidelines for cattle parentage verification based on SNP markers**. 2012. Disponível em: <http://www.isag.us/Docs/Guideline-for-cattle-SNP-use-for-parentage-2012.pdf>. Acesso em 20 de março de 2021.

ISAG. **ISAG cattle core and additional SNP panel 2013**. 2013. Disponível em: <http://www.isag.us/committees.asp?autotry=true&ULnotkn=true>. Acesso em: 18 de março de 2021.

JONES A. G.; SMALL, C. M.; PACZOLT, K. A.; RATTERMAN, N. L. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 1, p. 6–30, 2010.

KAHL, G.; MAST, A.; TOOKE, N.; SHEN, R.; BOOM, D. Single nucleotide Polymorphisms: Detection Techniques and Their Potential for Genotyping and Genome Mapping. *In: The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping*. 2005. p. 75-107.

KENNEDY, B. W.; SCHAEFFER, L. R.; SORENSEN, D. A. Genetic Properties of

Animal Models. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 17-26, 1988.

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. 1-12, 2012.

LAURI, A.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; LAGUTINA, I.; GENZINI, E.; BRAGA, F.; MARIANI, P.; WILLIAMS, J.L. Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies. **Genomics**, v. 101, p. 24-29, 2013.

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

LI, Y.; WILLER, C.; SANNA, S.; ABECASIS, G. Genotype Imputation. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 387–406, 2009.

LIU, C. T.; DENG, X.; FISHER, V.; HEARD-COSTA, N.; XU, H.; ZHOU, Y.; VASAN, R. S.; CUPPLES, L. A. Revisit Population-based and Family-based Genotype Imputation. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

LÔBO; R. N. B. **Importância da escrituração zootécnica para o desenvolvimento da caprino-ovinocultura.** 2011. Disponível em: <<http://srvgen.cnpc.embrapa.br/pagina/escrit.php>>. Acesso em: 25 de junho de 2021.

LOPES, P. S. Métodos de Seleção. *In*: LOPES, P. S. (org.). **Teoria do melhoramento animal.** Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora, 2005, 118 p.

LU, D.; MILLER, S.; SARGOLZAEI, M. Kelly, M.; VOORT, G.V.; CALDWELL, T.; WANG, Z.; PLASTOW, G.; MOORE, S. Genome-wide association analyses for growth and feed efficiency traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3612-3633, 2013.

MARCIANO, L. E. A.; MAIA, R. O. G.; SANTOS, M. S.; DUARTE, I. N. H.; BERNARDES, P. A.; CHUD, T. C. S.; REGITANO, L. C. A.; BUZANSKAS, M. E.

Estratégias de imputação em gado Canchim utilizando população de referência da raça Nelore. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 55. **Anais** [...] Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2018.

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

MILLER, S. Genetic improvement of beef cattle through opportunities in genomics. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 247-255, 2010.

MISZTAL, I.; AGGREY, S. E.; MUIR, W. M. Experiences with a single-step genome evaluation. **Poultry Science**, v. 9, p. 2530-2534, 2013.

MOGHADDAR, N.; GORE, K. P.; DAETWYLER, H. D.; HAYES, B. J.; WERF, J. H. V. D. Accuracy of genotype imputation based on random and selected reference sets in purebred and crossbred sheep populations and its effect on accuracy of genomic prediction. **Genetics Selection Evolution**, v. 22, p. 1-12, 2015.

MOGHADDASZADEH-AHRABI, S.; FARAJNIA, S.; RAHIMI-MIANJI, G.; NEJATI-JAVAREMI, A. A short and simple improved-primer extension preamplification (I-PEP) procedure for whole genome amplification (WGA) of bovine cells. **Animal Biotechnology**, v. 23, p. 24-42, 2012.

MRODE, R. A.; THOMPSON, R. **Linear models for the prediction of animal breeding values**. *In: MRODE, R. A (org)*. 2 ed. London: CAB International, 358 p., 2005.

MULLAART, E.; WELLS, D. Embryo Biopsies for Genomic Selection. *In: NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.* **Animal Biotechnology 2**. Switzerland: Springer International Publishing AG, p. 81–94, 2018.

MULDER, H. A.; CALUS, M. P. L.; DRUET, T.; SCHROOTEN, C. Imputation of genotypes with low-density chips and its effect on reliability of direct genomic values in Dutch Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 876-889, 2012.

NWOGWUGWU C. P.; KIM, Y.; CHUNG, Y. J.; JANG, S. B.; ROH, S. H.; KIM, S.; LEE, J. H.; CHOI, T. J.; LEE, S. H. Effect of errors in pedigree on the accuracy of estimated breeding value for carcass traits in Korean Hanwoo cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 7, p. 1057–1067, 2020.

O'BRIEN, A. M. P.; MÉSZÁROS, G.; UTSUNOMIYA, Y. T.; SONSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F.; TASSELL, C. P. V.; CARVALHEIRO, R.; SILVA, M. V. B.; SÖLKNER, 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, n. 1, p. 121–132, 2014.

PICCOLI, M. L.; BRACCINI, J.; CARDOSO, F. F.; SARGOLZAEI, M. LARMER, S. G.; SCHENKEL, F. S. Accuracy of genome-wide imputation in Braford and Hereford beef cattle. **BMC Genetics**, v. 15, p. 1-15, 2014.

PMGZ – Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos. **ABCZ lança avaliações genéticas do PMGZ Corte 20222**. In: FERREIRA, T (org.). Associação Brasileira de Criadores de Zebu. 2022. Disponível em: <https://www.abcz.org.br/noticias/noticia/28501/abcz-lanca-avaliacoes-geneticas-do-pmgz-corte-2022-2>. Acesso em 10 out. 2022.

PRYCE, J. E.; ARIAS, J.; BOWMAN, P. J.; DAVIS, S. R.; MACDONALD, K. A.; WAGHORN, G. C.; WALES, W. J.; WILLIAMS, Y. J.; SPELMAN, R. J.; HAYES, B. J. Accuracy of genomic predictions of residual feed intake and 250-day body weight in growing heifers using 625,000 single nucleotide polymorphism markers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, 2012.

RESENDE, M. D. V. D.; PEREZ, J. R. H. R. Melhoramento animal: predição de valores genéticos pelo modelo animal – BLUP em bovinos de leite, bovinos de corte, ovinos e suínos. **Archives of Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 17-29, 1999.

RESENDE, M. D. V.; SILVA, F. F.; LOPES, P. S.; AZEVEDO, C. F. **Seleção Genômica Ampla (GWS) via Modelos Mistos (REML/BLUP), Inferência Bayesiana (MCMC), Regressão Aleatória Multivariada (RRM) e Estatística Espacial**. Viçosa:

Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Estatística. 2012. 291 p.

ROSA, A. N. F.; MENEZES, G. R. O. Artigo: Papel do Zebu na pecuária de corte brasileira. **Embrapa**, Brasília, 2 fev. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9523901/artigo-papel-do-zebu-na-pecuaria-de-corte-brasileira>. Acesso em: 13 dez. 2022.

ROSA, A. N.; SILVA, L. O. C.; AMARAL, T. B. **Avaliação zootécnica e funcional de touros na fazenda**. Campo Grande: Embrapa, 2003. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104655/1/Avaliacao-zootecnica-e-funcional.pdf>. Acesso em 8 jun. 2021.

SAADI, H. A. S.; VIGNEAULT, C.; SARGOLZAEI, M.; GAGNÉ, D.; FOURNIER, E.; MONTERA, B.; CHESNAIS J.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-16, 2014.

SABINA, J.; LEAMON, J. H. Bias in Whole Genome Amplification: Causes and Considerations. **Methods in Molecular Biology**, p. 15-41, 2015.

SANARANA, Y. P.; MAIWASHE, A.; BERRY, D. P.; BANGA, C.; MARLE-KÖSTER E, V. Evaluation of the International Society for Animal Genetics bovine single nucleotide polymorphism parentage panel in South African Bonsmara and Drakensberger cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, 2021.

SANTOS, V. S. **DNA**. Brasil Escola, 2022. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/dna.htm>. Acesso em 16 jan. 2023.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-12, 2014.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. Accuracy of a family-based genotype imputation algorithm. **GEB Open Industry Session**. Saint-Hyacinthe

Quebec, Canada, 2010.

SEABURY, C. M.; OLDESCHULTE, D. L.; SAATCHI, M.; BEEVER, J. E.; DECKER, J. E.; HALLEY, Y. A.; BHATTARAI, E. K.; MOLAEI, M.; FREETLY, H. C.; HANSEN, S. L.; YAMPARA-IQUISE, H.; JOHNSON, K. A.; KERLEY, M. S.; KIM, J.; LOY, D. D.; MARQUES, E.; NEIBERGS, H. L.; SCHNABEL, R. D.; SHIKE, D. W.; SPANGLER, M. L.; WEABER, R. L.; GARRICK, D. J.; TAYLOR, J. F. Genome-wide association study for feed efficiency and growth traits in U.S. beef cattle. **BMC Genomics**, v. 18, 2017.

SILVA, M. C.; BOAVENTURA, V. M.; FIORAVANTI, M. C. S. História do povoamento bovino no Brasil central. **Revista UFG**, n. 13, p. 34-41, 2012.

SOCIETY FOR MUCOSAL IMMUNOLOGY. **Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Allele Frequency DNA Pools**. 2014. Disponível em: <https://www.socmucimm.org/news-media/single-nucleotide-polymorphism-snp-allele-frequency-dna-pools/>. Acesso em 16 jan. 2023.

SOUSA, R. V.; CARDOSO, C. R. S.; BUTZKE, G.; DODE, M. A. N. D; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Biopsy of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* does not affect pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 90, p. 25-31, 2017.

SUMÁRIO GENEPLUS. **Sumário de Touros da Raça Nelore Genômica – Janeiro/2022**. In: Programa Embrapa Geneplus, 2022. Disponível em: <https://geneplus.com.br/sumario-nelore-2022-1s/>. Acesso em 10 out. 2022.

SUMÁRIO PMGZ. **Raça Nelore**. In: Sumário Raça Nelore. PMGZ - Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos, 2022. Disponível em: https://www.abczstat.com.br/comunicacoes/sumario/apresentacao/raca_nelore.pdf. Acesso em 23 out. 2022.

TALENTI, A.; NICOLAZZI, E. L.; CHESSA, S.; FRATTINI, S.; MORETTI, R.; COIZET, B.; NICOLOSO, L.; COLLI, L.; PAGNACCO, G.; STELLA, A.; AJMONE-MARSAN, P.; PTAK, G.; CREPALDI, P. A method for single nucleotide polymorphism selection for

parentage assessment in goats. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3646–3653, 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; GUZMAN, F.; SILVA-ARIAS, G. A.; SPERB-LUDWIG, F.; VETO, N. M. Polimorfismo de Nucleotídeo único (SNP): metodologias de identificação, análise e aplicações. *In*: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (org.). **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

UTSUNOMIYA, Y. T.; CARMO, A. S.; CARVALHEIRO, R.; HAROLDO, H. R.; NEVES, M. C. M.; ZAVAREZ, L. B.; BRIEN, A. M. P. O.; SÖLKNER, J.; MCEWAN, J. C.; COLE, J. B.; TASSELL, C. P. V.; SCHENKEL, F. S.; SILVA, M. V. G. B.; PORTO NETO, L. R.; SONSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F. Genome-wide association study for birth weight in Nelore cattle points to previously described orthologous genes affecting human and bovine height. **BMC Genetics**, v. 14, 2013.

VANRADEN, P. M. Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4414-4423, 2008.

VENTURA, R. V.; LU, D.; SCHENKEL, F. S.; WANG, Z.; LI, C.; MILLER, S. P. Impact of reference population on accuracy of imputation from 6K to 50K single nucleotide polymorphism chips in purebred and crossbreed beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 1433-1444, 2014.

VENTURA, R. V.; MILLER, S. P.; DODDS, K. G.; AUVRAY, B.; LEE, M.; BIXLEY, M.; CLARKE, S. M.; MCEWAN, J. C. Assessing accuracy of imputation using different SNP panel densities in a multi-breed sheep population. **Genetics Selection Evolution**, v. 48, 2016.

VIACAVA, C.; CASTANHO FILHO, E. P.; PIRES, G.; JOSAHKIAN, L. A.; BARBOSA JR., N. S.; PINEDA, N.; FELÍCIO, P. E.; LÔBO, R. B. **Nelore: o boi ecológico que está conquistando o mundo**. São Paulo: Petrópolis, 39 p., 2000.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other

types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, 2002.

VISSCHER, P. M.; WOOLLIAMS, J. A.; SMITH, D.; WILLIAMS, J. L. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2368-2375, 2002.

WEBER, K. L.; THALLMAN, R. M.; KEELE, J. W.; SNELLING, W. M.; BENNETT, G. L.; SMITH, T. P.; MCDANELD, T. G.; ALLAN, M. F.; EENENNAAM, A. L. V.; KUEHN, L. A. Accuracy of genomic breeding values in multibreed beef cattle populations derived from deregressed breeding values and phenotypes. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 4177-4190, 2012.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationships. **The American Naturalist**, v. 56, n. 645, p. 330-338, 1922.

4 HIPÓTESE

- i) O número de marcadores presentes no painel ISAG é insuficiente para o reconhecimento da paternidade dos animais da raça Nelore.
- ii) É possível realizar a avaliação genética genômica de embriões de bovinos Nelore a partir da genotipagem de embriões biopsiados.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o melhoramento genético da raça Nelore através da verificação eficiente da paternidade dos animais por meio de painéis customizados com diferentes densidades, e pela realização da avaliação genética de embriões biopsiados.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a aplicabilidade do painel ISAG e de outros painéis customizados com diferentes números de marcadores na verificação da paternidade de animais da raça Nelore.

Avaliar a viabilidade de se realizar a predição do valor genético genômico a partir das informações obtidas na genotipagem de embriões biopsiados de animais da raça Nelore.

6 ARTIGO A:

USO DE PAINÉIS DE SNPs DE DIFERENTES DENSIDADES PARA A REALIZAÇÃO DE TESTE DE PATERNIDADE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO

A escrituração zootécnica dos criatórios deve ser criteriosa, entretanto, erros no registro genealógico ou a ausência desse tipo de informação podem ocorrer, influenciando diretamente na qualidade da avaliação genética dos animais. Nesse sentido, o uso de ferramentas genômicas, como os marcadores moleculares, auxiliam na identificação correta do parentesco do indivíduo. O painel de marcadores ISAG foi desenvolvido pela *International Society of Animal Genetics* com a finalidade de identificação da paternidade dos animais, todavia, a raça Nelore não foi incluída na confecção deste painel. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a aplicabilidade do painel ISAG e compará-lo com painéis customizados para verificação da paternidade em bovinos da raça Nelore. Foram genotipados 2027 animais com painel de alta densidade (Painel HD), sendo 1883 progênie e 144 touros. O controle de qualidade foi realizado com a remoção dos SNPs com *call rate* menor que 98%, com a mesma posição, posição desconhecida e presentes nos cromossomos sexuais. Após o controle de qualidade, o número de marcadores que permaneceu no Painel HD foi de 612154. A paternidade das progênie foi avaliada com o software FImpute, com os seguintes painéis: Painel HD, Painel LD (10K SNPs), Painel ISAG (166 SNPs), Painel 100 (98 SNPs + Painel ISAG), Painel 200 (206 SNPs + Painel ISAG) e Painel 300 (311 SNPs + Painel ISAG). Os SNPs do Painel LD foram escolhidos aleatoriamente, enquanto os demais painéis contemplaram os marcadores escolhidos por meio da divisão do genoma em janelas, definidas de acordo com o número de marcadores a serem escolhidos, e dentro de cada janela escolheu-se o marcador com maior MAF. Entre os painéis customizados, o painel ISAG reconheceu somente 26 animais com a paternidade incorreta, atribuindo corretamente a paternidade de apenas 32 animais, enquanto o Painel 100 reconheceu que 1758 animais possuíam conflito de parentesco e atribui, corretamente, aproximadamente 94% das paternidades. O Painel 200 foi eficiente para validação do parentesco de todas as progênie. Com isso, conclui-se que o painel ISAG não é suficiente para avaliar a paternidade de animais da raça Nelore criados nacionalmente, sendo necessário acrescentar 206 SNPs a este painel para se obter a identificação correta entre touro e progênie.

Palavras-chave: Gado de corte; Genômica; Marcador molecular; Parentesco; Zebuínos.

USE OF SNP PANELS OF DIFFERENT DENSITIES FOR PATERNITY TESTING IN NELORE CATTLE

ABSTRACT

Livestock breeding records must be rigorous, however, errors in the genealogical registry or the absence of this type of information may occur, directly influencing the quality of the genetic evaluation of animals. In this sense, the use of genomic tools, such as molecular markers, assists in the correct identification of the individual's parentage. The ISAG marker panel was developed by the International Society of Animal Genetics for the purpose of identifying animal paternity, however, the Nelore breed was not included in the construction of this panel. Thus, the aim of the study was to evaluate the applicability of the ISAG panel and compare it with custom panels for verifying paternity in Nelore cattle. A total of 2,027 animals were genotyped with a high-density panel (HD panel), including 1,883 progenies and 144 bulls. Quality control was performed by removing SNPs with a call rate lower than 98%, with the same position, unknown position, and those present on the sex chromosomes. After quality control, the number of markers remaining on the HD Panel was 612,154. The paternity of the progenies was evaluated on the FImpute software, using the following panels: HD Panel, LD Panel (10K SNPs), ISAG Panel (166 SNPs), Panel 100 (98 SNPs + ISAG Panel), Panel 200 (206 SNPs + ISAG Panel) and Panel 300 (311 SNPs + ISAG Panel). The LD Panel SNPs were randomly chosen, while the other panels included markers chosen by dividing the genome into windows, defined according to the number of markers to be chosen. Within each window, the marker with the highest MAF was chosen. Among the custom panels, the ISAG Panel recognized only 26 animals with incorrect paternity, correctly attributing the paternity of only 32 animals, while Panel 100 recognized that 1,758 animals had parentage conflicts and correctly identified approximately 94% of the paternities. Panel 200 was efficient for validating the parentage of all progenies. Therefore, it can be concluded that the ISAG panel is not sufficient to evaluate the paternity of Nelore animals raised nationally, and it is necessary to add 206 SNPs to this panel to obtain the correct identification between bull and progeny.

Keywords: Beef cattle; Genomics; Molecular marker; Parentage; Zebu cattle.

INTRODUÇÃO

O conhecimento e uso das informações de desempenho e genealogia dos animais possibilita avaliar de forma eficiente quais indivíduos estão aptos para reprodução e que apresentam maior grau de parentesco, melhor desempenho, longevidade, entre outras características economicamente importantes para a eficiência do sistema de produção. A identificação correta do parentesco entre os indivíduos do rebanho torna a avaliação genética mais acurada. Erros no registro genealógico podem acarretar estimativas de valores genéticos viesadas e declinar a qualidade da avaliação genética (HARDER et al., 2005; NWOGWUGWU et al., 2020).

Uma das vantagens do uso de marcadores moleculares é o auxílio na correção das informações de parentesco, além de melhorar a acurácia das predições das avaliações para características de interesse econômico. O uso de marcadores moleculares para determinação da paternidade já foi explorado na produção animal, em bovinos leiteiros (VISSCHER et al., 2002; HAYES et al., 2009), ovinos (HEATON et al., 2014) e caprinos (TALENTI et al., 2016), por exemplo.

De acordo com Sanarana et al. (2021), para estabelecer painéis de marcadores baseados em SNP, é essencial que os marcadores escolhidos sejam informativos em várias populações bovinas. Isso é fundamental, uma vez que o princípio do método se baseia na seleção não aleatória, em que são selecionados alelos que estão segregando em altas frequências nas raças taurinas e zebuínas.

O'Brien et al. (2014) descreveram que animais da subespécie *Bos taurus indicus* apresentam, no geral, níveis mais baixos de desequilíbrio de ligação entre marcadores comparados aos animais da subespécie *Bos taurus taurus*, principalmente em distâncias curtas entre os marcadores. Nesse sentido, acredita-se que o número restrito de raças utilizadas na elaboração do painel desenvolvido pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG) para verificação de parentesco em bovinos pode, conseqüentemente, comprometer a aplicabilidade do painel em raças sub-representadas (SANARANA et al., 2021).

A raça Nelore não foi incluída entre aquelas avaliadas para a composição do painel ISAG para o teste de parentesco. Diante da importância nacional da raça, o objetivo desse estudo foi avaliar se o número de marcadores

presentes no painel ISAG é suficiente para identificar a paternidade, além de comparar diferentes painéis customizados a fim de validar um painel para verificação da paternidade em bovinos da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

ARQUIVO DE DADOS

O banco de dados utilizado neste o estudo é oriundo de animais da raça Nelore, provenientes de um programa de melhoramento genético e pertencentes ao Grupo de Genética e Melhoramento Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal/UNESP. Foram genotipados 2027 animais, sendo 1883 progênies e 144 touros. Todas as progênies possuíam informação de *pedigree*.

Os animais foram genotipados com BovineHD BeadChip da Illumina, composto por mais de 777 mil marcadores, os quais abrangem uniformemente todo o genoma bovino (Illumina, 2015).

A manipulação dos arquivos e o controle de qualidade foram realizados utilizando o *software* R (R Development Core Team, 2020). O controle de qualidade do arquivo de genótipos foi realizado com base no genoma de referência bovina ARS-UCD1.2. Foram eliminados SNPs com *call rate* menor que 98%, SNPs com a mesma posição ou posição desconhecida, e apenas SNPs presentes nos cromossomos autossômicos foram considerados para análise. Após o controle de qualidade, o número de marcadores que permaneceram no painel da Illumina de alta densidade foi de 612.154 (Painel HD).

PAINÉIS PARA TESTE DE PATERNIDADE

Para a primeira análise de verificação da paternidade, foi utilizado um painel contendo 10000 SNPs (Painel LD), escolhidos aleatoriamente a partir do Painel HD após o controle de qualidade.

O painel ISAG *additional*, recomendado para verificação de

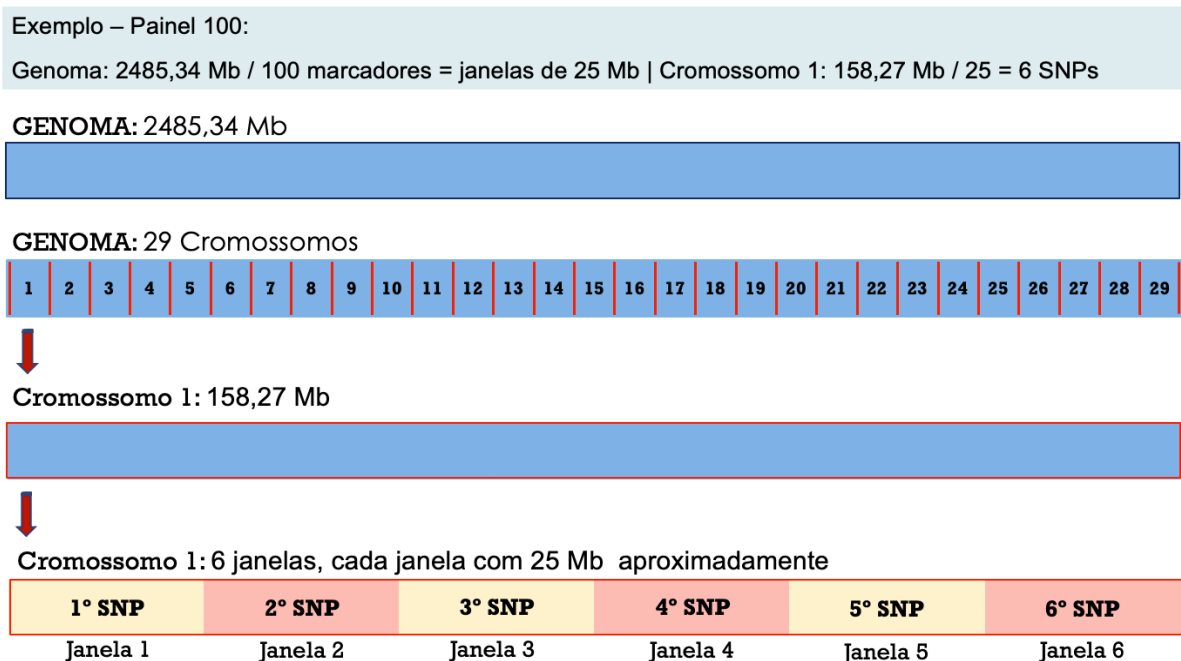
parentesco em raças zebuínas (ISAG, 2013), contém originalmente 200 SNPs, entretanto, o Painel ISAG utilizado nesse estudo foi composto por 166 SNPs, devido a 34 SNPs não estarem em comum com o arquivo de dados.

Foram testados cinco painéis, contendo variados números de SNPs, sendo eles:

- 1) Painel LD: 10000 SNPs
- 2) Painel ISAG: 166 SNPs
- 3) Painel 100: 98 SNPs escolhidos + 166 SNPs pertencentes ao Painel ISAG
- 4) Painel 200: 206 SNPs escolhidos + 166 SNPs pertencentes ao Painel ISAG
- 5) Painel 300: 311 SNPs escolhidos + 166 SNPs pertencentes ao Painel ISAG

O critério de seleção adotado para a escolha dos SNPs dos painéis customizados está ilustrado na Figura 1, utilizando o Painel 100 como exemplo. Primeiramente, todo o genoma foi dividido em janelas de acordo com o número de marcadores que se pretendia acatar. Dentro de cada janela, adotou-se o SNP com a maior frequência de alelo menor (MAF). No Painel 200 e no Painel 300, houve um marcador em comum com o Painel ISAG, assim, ele foi mantido e escolhido o marcador de maior MAF subsequente. A cobertura total do genoma foi de 2485,34 Mb, sendo que a cobertura por cromossomo e a quantidade de marcadores de cada painel customizado estão apresentados na Tabela 1.

Figura 1 – Exemplificação da escolha dos marcadores para compor o Painel 100



Fonte: o próprio autor

Tabela 1 - Descrição dos painéis customizados antes da inclusão dos SNPs do painel ISAG.

CHR ⁽¹⁾	Cobertura ⁽²⁾	Distância ⁽³⁾		Número de SNPs		
		Mínima	Máxima	Painel 100	Painel 200	Painel 300
1	158,27	0,000004	0,214819	6	13	20
2	136,04	0,000005	0,088342	5	11	17
3	120,87	0,000016	0,581281	5	10	15
4	119,65	0,000011	0,169735	5	10	15
5	120,04	0,000001	0,473213	5	10	15
6	117,67	0,000031	0,120474	5	10	15
7	110,63	0,000001	0,357426	4	9	14
8	113,18	0,000011	0,251081	5	9	14
9	104,63	0,000024	0,115895	4	9	13
10	103,24	0,000001	1,014275	4	9	13
11	106,85	0,000006	0,141925	4	9	13
12	87,12	0,000029	0,470376	3	7	11
13	83,24	0,000022	0,204227	3	7	10
14	82,38	0,000003	0,370331	3	7	10
15	84,92	0,000001	0,242235	3	7	11
16	80,75	0,000011	0,151157	3	7	10
17	73,11	0,000013	0,131222	3	6	9
18	65,66	0,000035	0,192719	3	5	8
19	63,38	0,000044	0,126844	3	5	8
20	71,94	0,000021	0,082633	3	6	9
21	69,83	0,000001	0,127708	3	6	9
22	60,61	0,000019	0,073035	2	5	8
23	52,44	0,000025	0,483396	2	4	7
24	62,20	0,000034	0,110318	2	5	8
25	42,24	0,000005	0,061553	2	4	5
26	51,97	0,000006	0,096553	2	4	6
27	45,60	0,000001	0,213464	2	4	6
28	45,81	0,000012	0,353865	2	4	6
29	51,05	0,000048	0,244911	2	4	6
Total	2485,34	-	-	98	206	311
Tamanho da janela (Mb)		-	-	24,85	12,43	8,28

¹Cromossomo; ²Distância entre o primeiro e o último SNP de cada cromossomo, em Megabases; ³Distância mínima e máxima entre os SNPs adjacentes, em Megabases; Mb = Megabases.

Fonte: o próprio autor.

Na Tabela 2 estão descritos os painéis utilizados no presente estudo, além das médias, valores mínimos e máximos da MAF e equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculados a partir do pacote *snpStats* (Clayton, 2021) do R.

Tabela 2 - Descrição dos painéis utilizados para o teste de paternidade.

Painel	N SNP ⁽¹⁾	CR ⁽²⁾	MAF ⁽³⁾			HWE ⁽⁴⁾		
			Média	Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo
HD	612154	1	0,1690	0,0000	0,5000	0,3820	-45,0330	5,8020
LD	10000	1	0,1668	0,0000	0,5000	0,3610	-8,9176	5,1815
ISAG	166	1	0,2130	0,0020	0,4998	0,4087	-2,3826	3,1875
100	264	1	0,3195	0,0020	0,5000	0,4482	-2,3826	3,1875
<i>Subset</i> ⁽⁵⁾	98	1	0,4999	0,4988	0,5000	0,5153	-2,0429	2,3982
200	372	1	0,3717	0,0020	0,5000	0,5365	-2,3826	3,8194
<i>Subset</i> ⁽⁵⁾	206	1	0,4997	0,4975	0,5000	0,6395	-2,0429	3,8194
300	477	1	0,3998	0,0020	0,5000	0,5189	-2,3826	4,3968
<i>Subset</i> ⁽⁵⁾	311	1	0,4995	0,4970	0,5000	0,5777	-2,0429	4,3968

¹Número de SNPs contidos no painel; ²CR: Call Rate; ³MAF: Minor Allele Frequency; ⁴HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium, escore z; ⁵*subset*: marcadores escolhidos a partir do painel HD.

Fonte: o próprio autor.

ANÁLISES

O *software* utilizado para verificar a paternidade dos animais por meio dos diferentes painéis foi o *Flmpute v2.2* (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014). Para o correto funcionamento do programa e realização do teste de parentesco, foi necessário estabelecer a população referência, composta de todos os animais, e a população de imputação, composta por 100 animais escolhidos aleatoriamente no arquivo de dados, que foram acrescidos de um “X” na identificação a fim de garantir a diferenciação. Essa divisão teve a finalidade de simular uma análise de imputação, etapa necessária para a apresentação do teste de parentesco fornecido pelo *software*, sendo realizado para todos os animais.

A primeira análise realizada foi a verificação da capacidade do programa em reconhecer se o *pedigree* estava correto. Dessa forma, atribuiu-se à população de imputação os genótipos presentes no Painel LD, para compor a

população e informações para imputação. Para todas as análises realizadas, os arquivos necessários e seus respectivos conteúdos utilizados pelo *software* foram:

1) Arquivo de mapa de marcadores: contendo as colunas de nome do marcador, cromossomo em que está localizado o marcador, posição do marcador (em pares de base), chip 1 (ordem em que o marcador está no Painel HD) e chip 2 (ordem em que o marcador está no painel a ser testado).

2) Arquivo de *pedigree*: contendo as colunas com as identificações de animal, pai, mãe e sexo, respectivamente.

3) Arquivo de genótipos: contendo a primeira coluna com a identificação dos animais e as demais colunas referentes ao genótipo 0 (AA), 1 (AB), 2 (BB) e 5 (ausente).

4) Arquivo de parâmetros: contendo as informações necessárias para a análise, conforme descrito no manual do *software* do FImpute (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014).

No arquivo de parâmetros, foi considerado o limite de 0,05 para a taxa de erro de incompatibilidades entre progênie e pai e o limite de 0,01 para a taxa de erro nas correspondências entre progênie e pai.

Na segunda análise, o arquivo de *pedigree* foi modificado de modo que todos os animais tivessem a paternidade alterada, gerando um novo arquivo de *pedigree* totalmente incorreto. A partir desse novo arquivo de *pedigree*, foram realizadas as cinco análises subsequentes, testando-se novamente o Painel LD e os demais, Painel ISAG, Painel 100, Painel 200 e Painel 300, respectivamente. Na Tabela 3 estão descritos os números de análises, painéis testados, quantidade de SNPs em cada painel e o arquivo de *pedigree* utilizado em cada testagem.

Tabela 3 - Descrição dos arquivos utilizados em cada análise realizada para o teste de paternidade.

Análise	Painel	N SNP ⁽¹⁾	Pedigree correto ⁽²⁾	Pedigree incorreto ⁽²⁾
1	LD	10000	X	
2	LD	10000		x
3	ISAG	166		x
4	100	264		x
5	200	304		x
6	300	477		x

¹Número de SNPs que contêm o painel; ²Arquivo de pedigree utilizado para análise.

Fonte: o próprio autor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira análise realizada para verificar a capacidade do *software* em reconhecer a autenticidade do arquivo de *pedigree*, o FImpute não identificou erros na paternidade das progênes a partir do arquivo de *pedigree* original, reconhecendo de maneira assertiva todos os pais das 1883 progênes com a utilização do Painel LD. Ao alterar o arquivo de *pedigree*, atribuindo o pai incorreto para cada animal, o *software* foi eficiente ao constatar que todos apresentavam erro na paternidade.

Na Tabela 4 estão apresentadas as frequências das indicações de paternidade e o número de inconsistências Mendelianas observadas entre os grupos com a paternidade correta e incorreta fornecidas pelo programa referente a todas as análises realizadas. Com a utilização do *pedigree* alterado, o *software* foi capaz de indicar que todas as progênes possuíam a paternidade incorreta, gerando 1898 combinações de progênie-touro, predizendo corretamente os pais dos 1883 animais, sendo 1715 animais de maneira única, ou seja, apenas um único touro indicado como pai. Algumas inversões ocorreram devido à ausência da informação de data de nascimento no arquivo de *pedigree*, impedindo o programa de organizar os animais em ordem cronológica e resultando na indicação de vários pais para um único animal. Nesse caso, refere-se a um touro com vários filhos, e seus filhos são eleitos como o seu possível pai. Na segunda análise, 51 animais apresentaram duas ou mais indicações de possíveis pais, além de outros 117 animais que não tiveram indicações de possíveis pais (*no match*). Entretanto, todos já haviam tido o parentesco corretamente identificado em combinações anteriores.

Avaliando ainda o Painel LD, observou-se que ocorreram 15 combinações de paternidade incorretas, sendo que, desse total, sete animais não apresentaram inconsistência Mendeliana (0) com o touro sugerido como possível pai e oito animais apresentaram uma ou mais inconsistências Mendelianas (mínimo 1 máximo 94) com o pai sugerido. Posteriormente, confirmou-se que os touros sugeridos para os animais desse grupo, com zero, uma ou mais inconsistências Mendelianas, não eram os verdadeiros pais. Contudo, notou-se que, no grupo de animais que tiveram a paternidade atribuída corretamente, aproximadamente 98% não apresentaram inconsistências Mendelianas entre os indivíduos. Segundo

Strucken et al. (2016), nas relações verdadeiras entre pais e filhos, não deve haver inconsistências Mendelianas e nenhum número de homozigotos opostos deve ocorrer entre os dois indivíduos, exceto para erros de genotipagem ou um evento de mutação.

Tabela 4 - Resultados do teste de parentesco e número de inconsistências Mendelianas (IM) entre progênie-touro sugeridos nos grupos com a paternidade correta e incorreta para os painéis testados.

	Painéis				
	LD	ISAG	100	200	300
Paternidade incorreta identificada pelo <i>software</i> ⁽¹⁾	1883	26	1758	1883	1883
Número de registros gerados pelo <i>software</i>	1898	63	1810	1895	1892
Número de animais com a paternidade					
<i>Correta</i>	1883	32	1773	1883	1883
<i>Incorreta</i>	15	31	37	12	9
Número de IM para a paternidade correta					
0	1844	32	1769	1879	1879
1	35	-	4	4	4
2	4	-	-	-	-
> 2	-	-	-	-	-
Número de IM para a paternidade incorreta					
0	7	2	6	9	9
1	2	29	6	-	-
2	-	-	25	1	-
> 2	6	-	-	2	-

¹Número de animais.

Fonte: o próprio autor.

Utilizando um painel para teste de parentesco composto por 3894 SNPs e 28115 pares de progênie-pai ou progênie-mãe em bovinos Red Sindhi, Panetto et al. (2018) verificaram que o número médio de conflitos Mendelianos entre os animais com os pais verdadeiros foi de $0,76 \pm 0,96$ (mínimo zero e máximo seis) e de $247,6 \pm 70,9$ entre os animais e os pais incorretos (mínimo 40 e máximo 556). De

maneira semelhante ao encontrado no estudo, o número de inconsistências Mendelianas para o grupo com a paternidade correta foi muito inferior comparado ao grupo dos animais com a paternidade incorreta em todas as análises.

Ao realizar a terceira análise com a utilização do Painel ISAG, constatou-se que este painel não foi suficiente para a identificação da paternidade dos animais através do *software* FImpute. Foram identificadas somente 26 incompatibilidades entre pai e filho no arquivo de *pedigree* (Tabela 4). Ao investigar as indicações de parentesco entre os animais, foram contabilizados 63 registros. Observa-se que 32 animais tiveram a paternidade verdadeira reconhecida e todas sem inconsistência Mendeliana. Verificou-se também que 31 animais apresentaram paternidade incorreta, com aproximadamente 93% das indicações com apenas uma inconsistência Mendeliana. Dessa maneira, alerta-se que o Painel ISAG não foi suficiente para a verificação da paternidade dos bovinos da raça Nelore avaliados.

O Painel ISAG utilizado nesse estudo conteve cerca de 83% dos SNPs recomendados no painel ISAG original, composto pelos marcadores presentes nos painéis ISAG *core* e ISAG *additional* (ISAG, 2013). Esse resultado foi inferior ao relatado por Sanarana et al. (2021), que avaliaram o painel de parentesco ISAG em duas raças de bovinos sul-africanos e descreveram que dos 200 SNPs presentes no painel, 185 estavam em comum com o conjunto de dados utilizado, ou seja, continha mais de 90% dos marcadores em comum com os propostos pelo ISAG. Apesar desse resultado, Sanarana et al. (2021) relataram que o painel ISAG não foi suficiente para realizar a identificação dos touros e seus respectivos filhos nas raças Bonsmara e Drakensberger. Além disso, o painel resultou na indicação de múltiplos touros candidatos para um animal determinado.

McClure et al. (2015, 2018) analisaram os dados genotípicos de bovinos taurinos pertencentes a diversos grupos genéticos e com aptidões diferentes, relatando limitações para a validação do parentesco com a utilização do painel ISAG. De acordo com McClure et al. (2015, 2018), o painel ISAG *core* contém marcadores problemáticos, alguns com MAF muito baixa, sendo necessário um painel com no mínimo 500 SNPs, com alta MAF ($MAF > 0,45$) para prever apenas um pai em populações grandes.

Os painéis desenvolvidos para outra raça podem não funcionar bem em uma nova raça se o painel de marcadores tiver MAFs muito baixos na nova

população (STRUCKEN et al, 2016). Ademais, o número restrito de raças utilizadas no estabelecimento do painel ISAG pode, conseqüentemente, influenciar a aplicabilidade do painel em raças sub-representadas (SANARANA et al., 2021).

O Painel 100 testado foi insatisfatório na detecção da paternidade para todos os animais, indicando que dos 1883 indivíduos, 1758 possuíam incompatibilidades entre progênie-touro no arquivo de *pedigree*. O número de pais e filhos combinados foi superior ao da análise anterior, na qual foi utilizado somente o Painel ISAG. Na análise 4 foram contabilizadas 1810 combinações, em que 98% dos produtos (1773 animais) tiveram a paternidade atribuída corretamente, enquanto 37 animais não foram associados aos touros correspondentes (Tabela 4).

A partir da análise 5, com o uso dos painéis 200 e 300, foi possível identificar que 100% das progênies apresentaram erro na paternidade. Assim, o *software* propôs corretamente a paternidade de 100% dos produtos (Tabela 4). Nesse caso, quando foi incorporado ao Painel ISAG outros 206 SNPs ou mais, fez-se viável a obtenção de um resultado satisfatório para a paternidade dos animais da raça Nelore.

Para validação de parentesco, a questão crucial é a determinação da quantidade de marcadores para obter uma alta probabilidade de que os pais, geralmente apenas o pai, sejam indicados corretamente (MCCLURE et al., 2015).

Existem diversos trabalhos voltados à produção de bovinos que resultaram em composições de painéis com diferentes números de marcadores. Fisher et al. (2009) propuseram um painel contendo 40 SNPs, com MAF média de 0,35, sendo suficiente para realizar testes de parentesco, quando combinado com registros de acasalamento e datas de nascimento, em rebanhos leiteiros da Nova Zelândia. Strucken et al. (2016) recomendaram a utilização de painéis com pelo menos 200 SNPs para um teste de parentesco se apenas um genótipo parental for conhecido e permitindo erros de genotipagem de 1%. Entretanto, outros trabalhos reportaram que 300 ou mais SNPs seriam necessários para resolver questões relacionadas à paternidade com segurança (MCCLURE et al., 2015, 2018).

Gebrehiwot et al. (2021) avaliaram as informações genótípicas de bovinos leiteiros, em grande maioria mestiços, provenientes das regiões da África Ocidental e Oriental, e verificaram que um painel composto por 300 SNPs foi

consistente e preciso na averiguação do parentesco dos animais. Além disso, ao testarem outro com 200 SNPs e indicando ao *software* um arquivo com o grupo de possíveis pais e outro grupo composto por progênes, apontaram que esse método foi suficiente para avaliar o parentesco. Ainda segundo os autores, a escolha dos SNPs foi realizada inicialmente com base no marcador de maior MAF e distância mínima de um Mb.

Panetto et al. (2018) realizaram um estudo para propor um painel com o número mínimo de marcadores SNP para verificação de parentesco em bovinos da raça Red Sindhi no Brasil. Os autores propuseram um painel com no mínimo 71 marcadores como sendo suficiente. O controle de qualidade para a escolha dos marcadores foi baseado na eliminação dos SNPs com *call rate* abaixo de 0,98, ou MAF abaixo de 0,30, ou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P-valor < 0,20) e com base no desequilíbrio de ligação (PANETTO et al., 2018).

Com o objetivo de desenvolver um painel eficiente para a verificação do parentesco em bovinos mestiços Simental e Holandês na China, Hu et al. (2021) selecionaram os marcadores que apresentavam MAF maior que 0,3, distância genética entre marcadores no mesmo cromossomo acima de 5 cM e de acordo com a heterozigosidade. Com isso, os autores tiveram como resultado um painel contendo 50 SNPs distribuídos em 27 cromossomos autossomos e, entre esses SNPs, poucos pertenciam ao painel ISAG *core*. Os autores justificaram que a possível razão pela qual os SNPs para teste de paternidade variam significativamente entre diferentes populações é que os marcadores intimamente ligados à heterozigosidade e o *call rate* na população podem interferir na escolha dos marcadores de DNA para análise de parentesco.

De acordo com Strucker et al. (2016), a acurácia de um painel para teste de paternidade está mais relacionada ao número de marcadores utilizados do que às frequências alélicas individuais dos SNPs. Entretanto, os autores recomendaram a elaboração de painéis com MAF acima de 0,2. Caso não seja possível, a sugestão dos autores é aumentar o número de marcadores, especialmente se animais cruzados forem usados.

A coleta correta das informações fenotípicas e de genealogia é essencial para a manutenção de um programa de melhoramento genético. Combinar os dados da fazenda e os genotípicos para a análise de paternidade é uma opção

eficaz (FISHER et al., 2009), proporcionando maior confiabilidade nas avaliações genéticas posteriores. Entretanto, erros no registro dos pais podem ter origem de várias fontes: na fazenda, em centrais de inseminação artificial ou em laboratórios de genotipagem (MCCLURE et al., 2018). Por isso, a demanda por coleta de informações moleculares é cada vez maior, tanto para fins de seleção genômica, estudos de associação genômica, quanto para a correção do *pedigree* e da matriz de parentesco.

Sanders, Bennewitz e Kalm (2006) relataram que o efeito da atribuição incorreta da paternidade é mais prejudicial do que a ausência da informação do parentesco, impactando diretamente nas estimativas de ganho genético. Nessa condição, uma característica com menor herdabilidade terá maiores perdas de ganho genético do que uma característica com maior herdabilidade (HARDER et al., 2005). Dependendo da herdabilidade da característica, a perda no ganho genético pode ser reduzida quando se corrige a genealogia, e isso é uma das vantagens de se melhorar a qualidade das informações do *pedigree* por meio da aplicação de um programa contínuo de verificação e descoberta de parentesco (GARCÍA-RUIZ; WIGGANS; RUIZ-LÓPEZ, 2019).

Portanto, a elaboração de um painel para confirmação da paternidade é válida e corrobora com outras etapas importantes dentro do processo de seleção dos animais, como a avaliação genética, por exemplo. Nesse sentido, compreende-se que o número de SNPs necessário para compor um painel para verificação de paternidade envolve uma série de fatores como o grupo genético dos animais, frequência dos alelos, desequilíbrio de ligação entre os SNPs, erros de genotipagem e *softwares*.

CONCLUSÃO

O Painel ISAG não é suficiente para verificar a paternidade de bovinos da raça Nelore criados no Brasil. Assim, é necessário acrescentar 206 SNPs ao painel ISAG, escolhidos com base no marcador com maior MAF e separados por uma distância intracromossômica de 12,43 Mb, a fim de se obter a relação verdadeira entre pais-filhos por meio do software FImpute.

REFERÊNCIAS

BANOS, G.; WIGGANS, G. R.; POWELL, R. L. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2523–2529, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 45 de 15 de dezembro de 2017**. Aprova os critérios e requisitos específicos para o credenciamento de laboratórios que realizam testes de identificação genética e verificação de parentesco de animais pela análise do DNA. Brasília, 26 dezembro de 2017. Seção 1, p. 3-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13 de 3 de março de 2020**. Estabelece as regras e os procedimentos para a avaliação zoogenética, requisito necessário para a inscrição de reprodutores das espécies bovina, bubalina, ovina e caprina em centros de coleta e processamento de sêmen. Brasília, 5 de março de 2020. Seção 1, p. 2.

CLAYTON, D. **snpStats**: SnpMatrix and XSnpmatrix classes and methods. R package version 1.42.0., 2021.

FISHER, P. J.; MALTHUS, B.; WALKER, M. C.; CORBETT, G.; SPELMAN, R. J. The number of single nucleotide polymorphisms and on-farm data required for whole-herd parentage testing in dairy cattle herds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 369–374, 2009.

GARCÍA-RUIZ, A.; WIGGANS, G. R.; RUIZ-LÓPEZ, F. J. Pedigree verification and parentage assignment using genomic information in the Mexican Holstein population. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1806–1810, 2019.

GEBREHIWOT, N. Z.; STRUCKEN, E. M.; MARSHALL, K.; ALILOO, H.; GIBSON, J. P. SNP panels for the estimation of dairy breed proportion and parentage assignment in African crossbred dairy cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 53, n. 1, p. 1–18, 2021.

HARDER, B.; BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; MAYER, M.; KALM, E. Effect of missing sire information on genetic evaluation. **Archives Animal Breeding**, v. 48, n. 3, p. 219–232, 2005.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. C.; VERBYLA, K.; GODDARD, M. E. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, n. 1, p. 51, 24 dez. 2009.

HEATON M. P.; LEYMASTER, K. A.; KALBFLEISCH, T. S.; KIJAS, J. W.; CLARKE, S. M.; MCEWAN, J.; MADDOX, J. F.; BASNAYAKE, V.; PETRIK, D. T.; SIMPSON, B.; SMITH, T. P.; CHITKO-MCKOWN, C. G. SNPs for parentage testing and traceability in globally diverse breeds of sheep. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2014.

HU, L. R.; LI, D.; CHU, Q.; WANG, Y. C.; ZHOU, L.; YU, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, S. L.; USMAN, T.; XIE, Z. Q.; HOU, S. Y.; LIU, L.; SHI, W. H. Selection and implementation of single nucleotide polymorphism markers for parentage analysis in crossbred cattle population. **Animal**, v. 15, n. 1, 2021.

ILLUMINA. **BovineHD beadchip datasheet**. Illumina. 2015. Disponível em: https://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf. Acesso em 12 de abril de 2021.

ISAG. **Guidelines for cattle parentage verification based on SNP markers**. 2012. Disponível em: <http://www.isag.us/Docs/Guideline-for-cattle-SNP-use-for-parentage-2012.pdf>. Acesso em 20 de março de 2021.

ISAG. **ISAG cattle core and additional SNP panel 2013**. 2013. Disponível em: <http://www.isag.us/committees.asp?autotry=true&ULnotkn=true>. Acesso em 18 de mar 2021.

MCCLURE, M. C.; MCCARTHY, J. J.; FLYNN, P.; WELD, R.; KEANE, M.; O'CONNELL, K.; MULLEN, M. P.; WATERS, S. M.; KEARNEY, J. F. SNP selection for nationwide parentage verification and identification in beef and dairy cattle. *In*: International Committee For Animal Recording Technical Series, 17, 2015, Rome.

Anais [...]. Rome: ICAR, 2015. p. 175–181.

MCCLURE, M. C.; MCCARTHY, J.; FLYNN, P.; MCCLURE, J. C.; DAIR, E.; O'CONNELL, D. K.; KEARNEY, J. F. SNP data quality control in a National Beef and Dairy Cattle system and highly accurate SNP based parentage verification and identification. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 1–14, 2018.

MEUWISSEN, T. H.; 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.

NWOGWUGWU C. P.; KIM, Y.; CHUNG, Y. J.; JANG, S. B.; ROH, S. H.; KIM, S.; LEE, J. H.; CHOI, T. J.; LEE, S. H. Effect of errors in pedigree on the accuracy of estimated breeding value for carcass traits in Korean Hanwoo cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 7, p. 1057–1067, 2020.

O'BRIEN, A. M. P.; MÉSZÁROS, G.; UTSUNOMIYA, Y. T.; SONSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F.; TASSELL, C. P. V.; CARVALHEIRO, R.; SILVA, M. V. B.; SÖLKNER, 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, n. 1, p. 121–132, 2014.

PANETTO, J. C. C.; MACHADO, M. A.; SILVA, M. V. G. B.; BARBOSA, R. S.; SANTOS, G. G.; LEITE, R. M. H.; PEIXOTO, M. G. C. D. Parentage assignment using SNP markers, inbreeding and population size for the Brazilian Red Sindhi cattle. **Livestock Science**, v. 204, n. March, p. 33–38, 2017.

R CORE TEAM (2020). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SANARANA, Y. P.; MAIWASHE, A.; BERRY, D. P.; BANGA, C.; MARLE-KÖSTER E, V. Evaluation of the International Society for Animal Genetics bovine single nucleotide polymorphism parentage panel in South African Bonsmara and Drakensberger cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, 2021.

SANDERS, K.; BENNEWITZ, J.; KALM, E. Wrong and missing sire information affects genetic gain in the Angeln dairy cattle population. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 315–321, 2006.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2014.

STRUCKEN, E. M.; LEE, S. H.; LEE, H. K.; SONG, K. D.; GIBSON, J. P.; GONDRO, C. How many markers are enough? Factors influencing parentage testing in different livestock populations. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 133, n. 1, p. 13–23, 2016.

TALENTI, A.; NICOLAZZI, E. L.; CHESSA, S.; FRATTINI, S.; MORETTI, R.; COIZET, B.; NICOLOSO, L.; COLLI, L.; PAGNACCO, G.; STELLA, A.; AJMONE-MARSAN, P.; PTAK, G.; CREPALDI, P. A method for single nucleotide polymorphism selection for parentage assessment in goats. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3646–3653, 2016.

VISSCHER, P. M.; WOOLLIAMS, J. A.; SMITH, D.; WILLIAMS, J. L. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2368–2375, 2002.

7 ARTIGO B:

PREDIÇÃO GENÔMICA DE EMBRIÕES BIOPSIADOS DE BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO

A seleção genômica tem a finalidade de utilizar marcadores como ferramentas auxiliares na predição de valores genéticos mais acurados. Nesse sentido, buscando-se a eficiência na produção animal, se a predição do valor genético ocorresse na fase embrionária, antes da implantação, a seleção dos indivíduos superiores no rebanho ocorreria precocemente, proporcionando redução nos custos de produção com o uso de animais mais jovens e produtivos, além da diminuição do intervalo de gerações. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade da predição dos valores genéticos de embriões biopsiados, com painéis de moderada densidade e imputados para painéis com maiores densidades. Todos os animais envolvidos no estudo foram da raça Nelore participantes de programa de melhoramento genético nacional, sendo avaliadas as informações de 93 embriões provenientes da coleta dos óvulos de 28 doadoras, que foram fertilizados *in vitro* utilizando sêmen de dois touros. Todos os embriões foram genotipados utilizando o chip 50K e posteriormente os genótipos foram imputados para o painel HD, sendo a qualidade da genotipagem dos embriões mensurada por meio do *call rate* das amostras. Os embriões foram implantados nas vacas receptoras e, após o nascimento, a genotipagem de 10 bezerros foi realizada, assim como a estimativa dos seus valores genéticos genômicos. Posteriormente, o índice genético genômico foi estimado para os embriões e respectivos bezerros e verificou-se a correlação entre eles. A qualidade da genotipagem dos embriões foi satisfatória, sendo o *call rate* médio das amostras de 93%, a média de heterozigosidade dos genótipos imputados (22,5%) foi maior do que nos genótipos observados (11,7%), e a correlação observada entre os índices de seleção de embrião e bezerro foi de 99,3%. Nesse sentido, recomenda-se o uso da imputação para elevar a qualidade dos genótipos dos embriões e, conseqüentemente, dos parâmetros avaliados. Assim, existe a possibilidade de se escolher indivíduos superiores ainda na fase embrionária.

Palavras-chave: FIV; Gado de corte; Imputação; Seleção; SNP.

GENOMIC PREDICTION OF BIOPSIED EMBRYOS OF NELORE CATTLE

ABSTRACT

Genomic selection aims to use markers as auxiliary tools in predicting more accurate genetic values. In this sense, aiming for efficiency in animal production, if the prediction of genetic value occurred in the embryonic phase, before implantation, the selection of superior individuals in the herd would occur early, providing a reduction in production costs with the use of younger and more productive animals, as well as a decrease in generation interval. Thus, the objective of this study was to evaluate the feasibility of predicting genetic values of biopsied embryos, with panels of moderate density imputed to panels with higher densities. All animals involved in the study were Nelore breed participants in a national genetic improvement program, and information from 93 embryos collected from 28 donors was evaluated, which were fertilized in vitro using semen from two bulls. All embryos were genotyped using the 50K chip, and subsequently, genotypes were imputed to the HD panel. The genotyping quality of the embryos was measured by the call rate of the samples. The embryos were implanted in recipient cows, and after birth, genotyping of 10 calves was performed, as well as the estimation of their genomic genetic values. Subsequently, the genomic genetic index was estimated for the embryos and their respective calves, and the correlation between them was verified. The genotyping quality of the embryos was satisfactory, with a mean call rate of 93% for the samples, the mean heterozygosity of imputed genotypes (22.5%) was higher than in observed genotypes (11.7%), and the observed correlation between embryo and calf selection indexes was 99.3%. Therefore, the use of imputation is recommended to improve the quality of embryo genotypes and, consequently, the evaluated parameters. Thus, there is the possibility of choosing superior individuals even in the embryonic phase.

Keywords: FIV; Beef cattle; Imputation; Selection; SNP.

INTRODUÇÃO

A adoção da seleção genômica em programas de melhoramento de bovinos proporcionou aumento no progresso genético, principalmente em rebanhos leiteiros, servindo como referência e para aplicação em outras espécies de interesse econômico (HAYES et al., 2009; VANRADEN, 2020). Na bovinocultura de corte, vários estudos utilizaram análises genômicas para identificação de variantes genéticas de diversas características de interesse econômico, como para a eficiência alimentar (PRYCE et al., 2012; LU et al., 2013; SEABURY et al., 2017), além do ganho na acurácia da predição dos valores genéticos genômicos para características de carcaça em diferentes populações bovinas (WEBER et al., 2012; BOLORMAA et al., 2013; FUJII et al., 2019).

Mullaart e Wells (2018) explicaram que a seleção baseada em informações genômicas pode ser realizada ainda no embrião, na fase pré-implantação, sendo possível escolher apenas os melhores indivíduos do sexo e com genótipo desejável, eliminando aqueles portadores de problemas genéticos. A biópsia do embrião é rotineiramente realizada para várias aplicações, como sexagem, detecção de defeitos de um único gene, cor da pelagem e identificação de alelos candidatos específicos (SAADI et al., 2014; MULLAART, WELLS, 2018). Porém, a quantidade de DNA obtida a partir de uma biópsia de 10 a 15 células é de aproximadamente 60 a 90 picogramas (pg), o que é insuficiente para a genotipagem de SNP, sendo necessária a tecnologia de amplificação completa do genoma a fim de aumentar o teor de DNA de inicial antes da genotipagem do SNP (FUJII et al., 2019). Dessa forma, a amplificação total do genoma permite a realização da análise genética a partir de amostras de DNA extremamente pequenas (SAADI et al., 2014; SABINA; LEAMON, 2015; FUJII et al., 2021). Entretanto, o processo de biópsia de um embrião seguida da pré-amplificação do DNA para a genotipagem é um procedimento tecnicamente desafiador e propenso a erros, como a perda de alelo nos locos heterozigotos (LAURI et al., 2013; MULLAART, WELLS, 2018).

A frequente ocorrência de erros na obtenção do genótipo pode comprometer a predição genômica e tornar inviável a seleção utilizando informações a partir do DNA. Para amenizar parte dos erros de genotipagem, Saadi et al. (2014)

sugeriram genotipar os genitores dos embriões e usar essas informações visando corrigir inconsistências, seguidas pela imputação para prever genótipos ausentes.

A seleção genômica baseada na informação obtida em embriões pode ser usada em programas de melhoramento a fim de acelerar a taxa de ganho genético em comparação com a seleção genômica realizada após o nascimento dos animais, devido à maior intensidade de seleção entre embriões completos e meios-irmãos (MULLAART, WELLS, 2018). Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade de se obter a predição genômica de embriões biopsiados de bovinos da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais envolvidos no estudo foram todos da raça Nelore, pertencentes a um rebanho comercial localizado na região oeste do estado da Bahia, participante de programa de melhoramento genético nacional. Foram produzidos 93 embriões, provenientes da coleta dos óvulos de 28 doadoras, que foram fertilizados *in vitro* com sêmen de dois touros.

A biópsia dos embriões e a extração do DNA foram realizadas conforme protocolo desenvolvido pela In Vitro Brasil S/A (Mogi Mirim, São Paulo, Brasil). O DNA extraído foi amplificado usando kits comerciais baseados em amplificação de deslocamento múltiplo (REPLI-g, Qiagen, Mississauga, ON, Canadá). Posteriormente, realizou-se a genotipagem dos embriões, doadoras e touros utilizando-se o chip Illumina Bovine 50K v2 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

O *software* FImpute v2.2 (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014) foi utilizado de maneira semelhante ao realizado por Saadi et al. (2014) para verificar inconsistências Mendelianas, corrigir erros de genotipagem e imputar genótipos ausentes. Como os pais dos embriões também foram genotipados, as informações parentais foram inicialmente utilizadas pelo FImpute como principal fonte de informação para correção das inconsistências. Em seguida, os genótipos fixos de 50 mil marcadores (50K) foram imputados aos genótipos de alta densidade (HD) (Illumina Bovine HD chip), utilizando informações de família e de população

pertencentes ao banco de dados do programa de melhoramento genético responsável pela avaliação dos animais.

O controle de qualidade do arquivo de genótipos foi realizado pela eliminação de SNPs não autossômicos e com a mesma posição no cromossomo, com base no genoma de referência bovina ARS-UCD1.2. Inicialmente o painel de 50K continha 54.609 SNPs. Após o controle de qualidade, as análises foram realizadas usando 34.900 SNPs do chip 50K e 615.397 SNPs do chip HD.

A qualidade dos genótipos dos embriões foi avaliada pela comparação entre os genótipos aferidos e imputados, observando-se a proporção de genótipos lidos (*call rate*), além da avaliação realizada após o nascimento e genotipagem dos bezerros resultantes, comparando os pares embrião-bezerro.

O gênero dos embriões foi verificado com base nos dados genômicos, através da verificação da heterozigosidade do cromossomo X, utilizando-se o pacote *snpStats* v1.38 (CLAYTON, 2020) do *software* R (R Core Team, 2020). Para a classificação, considerou-se apenas amostras com *call rate* superior a 90%. As amostras com heterozigose igual ou acima de 0,07 foram classificadas como fêmeas, amostras com heterozigose até 0,03 foram classificadas como machos, e aquelas com heterozigose acima de 0,03 e abaixo de 0,07 foram classificadas como inconclusivas, semelhante à metodologia descrita por Anderson et al. (2010).

A taxa de erro foi calculada em relação ao número de genótipos lidos incorretamente em cada amostra de embrião, conforme explicado por Saadi et al. (2014), sendo dividida em três categorias: perda da heterozigosidade (AB → AA), ganho de heterozigosidade (AA → AB) e reversão homozigótica (AA → BB).

Os embriões biopsiados foram implantados em vacas receptoras, também da raça Nelore, cujo grupo apresentou 31% de taxa de prenhez, a qual foi semelhante à apresentada por um grupo controle (embriões não biopsiados) de 24%. Após o nascimento foram selecionados 10 bezerros que apresentaram *call rate* acima de 90% quando embriões, para a genotipagem com chip Illumina Bovine 50K v2 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

Os embriões e os respectivos bezerros tiveram seus valores genômicos diretos (VGD) calculados com base em seus genótipos imputados e na equação de predição do programa de melhoramento ao qual a fazenda está inserida.

O índice de seleção e a respectiva acurácia, adotados pelo do programa de melhoramento, também foram calculados para os embriões e bezerros. A população de referência para imputação e predição genômica utilizada neste estudo possuía oito mil animais. Os VGDs e suas acurácias foram calculados usando o *software* GEBV (SARGOLZAEI et al. 2013). Assim, verificou-se a correlação existente entre os genótipos obtidos via biópsia do embrião e pós-natal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

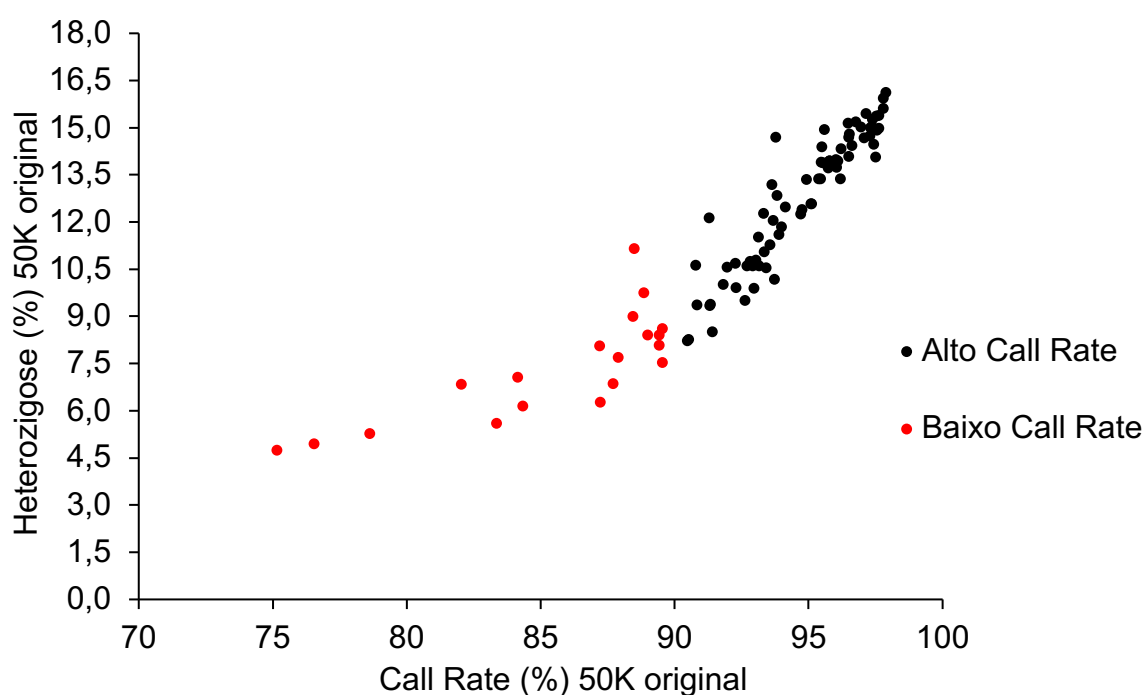
A qualidade da genotipagem dos embriões foi mensurada por meio do *call rate* das amostras, cuja média foi de 93%, variando de 75,1 a 97,9%, sendo que 74 embriões, cerca de 80% das amostras avaliadas, apresentaram *call rate* acima de 90% utilizando o chip com 50K marcadores. Os 19 embriões restantes que possuíam baixo *call rate* (<90%) também apresentaram menores níveis de heterozigosidade, com média de 7,4%, variando de 4,7 a 11,2% (Gráfico 1). Isso indica que a baixa qualidade na leitura dos genótipos implica na perda da heterozigosidade, provavelmente ocasionada pelos processos de manipulação do material genético até a genotipagem.

Fujii et al. (2019), ao avaliarem a eficiência de um sistema de seleção genômica na fase da pré-implantação de embriões para características de carcaça em bovinos japoneses, observaram que embriões biopsiados com aproximadamente 15 células tiveram *call rate* significativamente ($P < 0,01$) maior (98,1%) do que amostras com aproximadamente 5 células (91,5%), utilizando painéis contendo 7.931 SNPs. Em outro estudo, Fuji et al. (2021) avaliaram a possibilidade da genotipagem de embriões bovinos fertilizados *in vitro* a partir da extração do DNA, por meio da técnica de separação de blastômeros com posterior amplificação do genoma inteiro, e observaram *call rate* variando entre 98,3 e 99,3% com chip de 50K.

Pantiukh et al. (2019), ao analisarem a genotipagem de embriões biopsiados de bovinos leiteiros com painel de 50K marcadores, constataram que as 78 amostras avaliadas no estudo possuíam qualidade satisfatória com *call rate* superior a 95%.

Ao testar painéis contendo 10K e 50K marcadores SNPs, Mullaart e Wells (2018) observaram *call rate* de 84% e 90%, respectivamente, das quais mais de 80% das amostras apresentaram *call rate* acima de 85% em ambos os painéis. Assim, os autores sugerem o uso de genótipos que apresentem *call rate* acima de 85% em escala comercial. Dessa forma, os resultados são muito aceitáveis e podem ser usados a fim de calcular valores genéticos estimados genômicos para a seleção de embriões em programas de melhoramento comercial (MULLAART, WELLS, 2018).

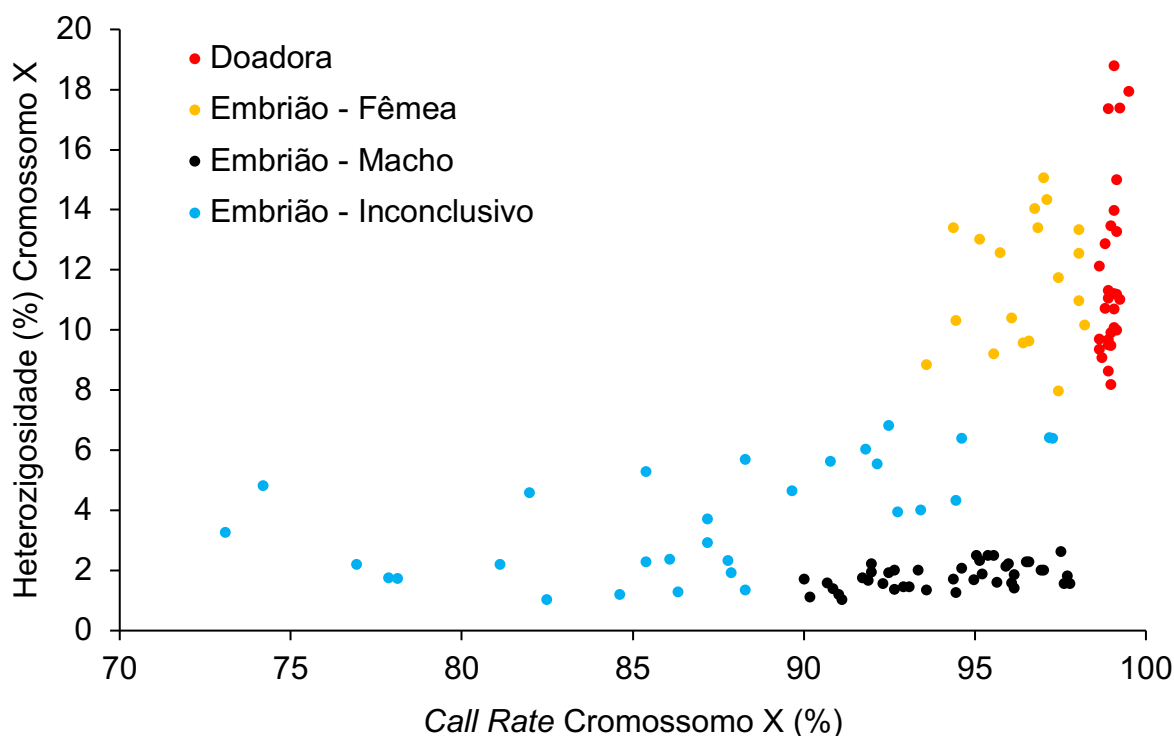
Gráfico 1 – *Call rate* e heterozigose dos genótipos de 50K original dos embriões de bovinos da raça Nelore



Fonte: o próprio autor.

O gênero dos embriões foi determinado com base nos dados genômicos através da verificação da heterozigosidade do cromossomo X. Anderson et al. (2010) explicaram que os machos possuem apenas uma cópia do cromossomo X e, por isso, não podem ser heterozigotos para qualquer marcador que não esteja na região pseudoautossômica do cromossomo X. Assim, ao avaliar o gênero dos 93 embriões, determinou-se que havia 41 machos, 19 fêmeas e 33 embriões não apresentaram heterozigosidade conclusiva para a classificação do gênero (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Determinação do sexo dos embriões de bovinos da raça Nelore, *call rate* e heteroziguidade do cromossomo X

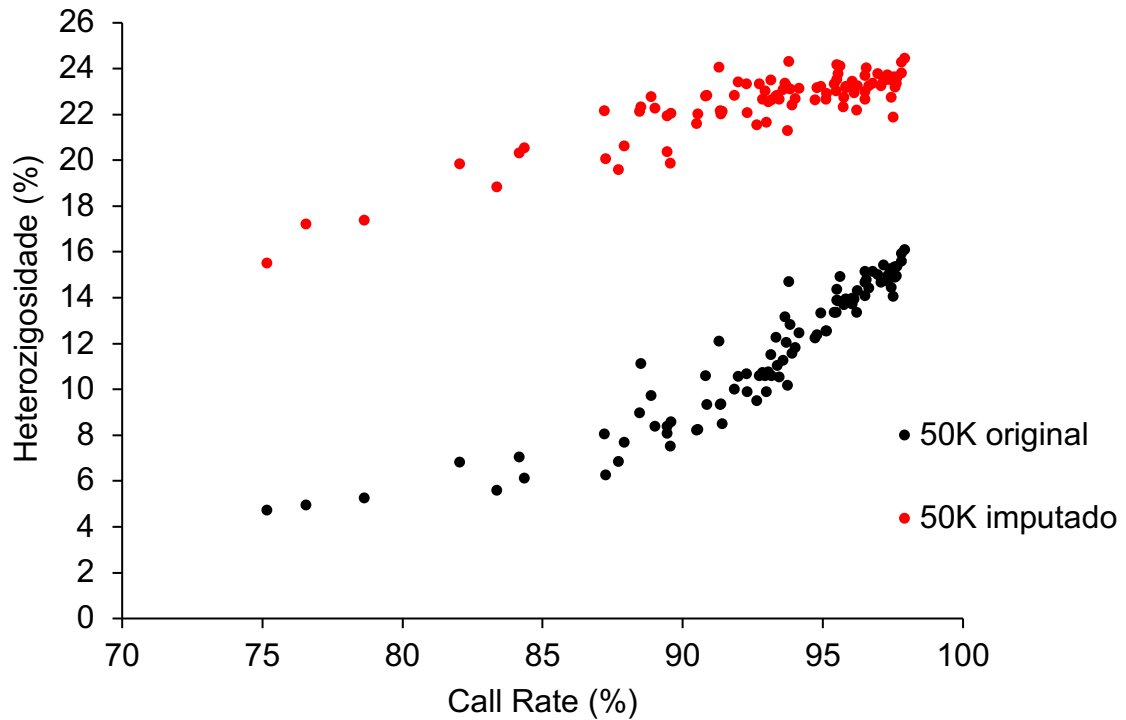


Fonte: o próprio autor.

Realizou-se a análise de parentesco entre as amostras e verificou-se que 17 embriões apresentaram conflitos de parentesco com base no genótipo de 50K, possuindo mais de 319 inconsistências Mendelianas quando comparados a seus verdadeiros pais. Uma possível explicação para a baixa qualidade dos genótipos de algumas amostras está relacionada aos processos de extração e amplificação do DNA, que afetaram a qualidade da genotipagem e impactaram nos resultados dos parâmetros analisados.

Após suceder com a imputação dos genótipos do painel de 50K para HD, observou-se que o *software* FImpute realizou as correções de todas as inconsistências Mendelianas existentes entre embriões e seus respectivos pais, além de prever todos os genótipos ausentes, melhorando a qualidade dos genótipos, com *call rate* igual a 100% para os painéis de 50K e HD. Houve aumento na média de heteroziguidade dos genótipos imputados (média igual a 22,5%) quando comparados aos genótipos observados (média igual a 11,7%), principalmente para o grupo de animais que inicialmente apresentaram baixo *call rate* (Gráfico 3).

Gráfico 3 – *Call rate* e heterozigosidade dos genótipos 50K original e imputados para HD dos embriões de bovinos da raça Nelore

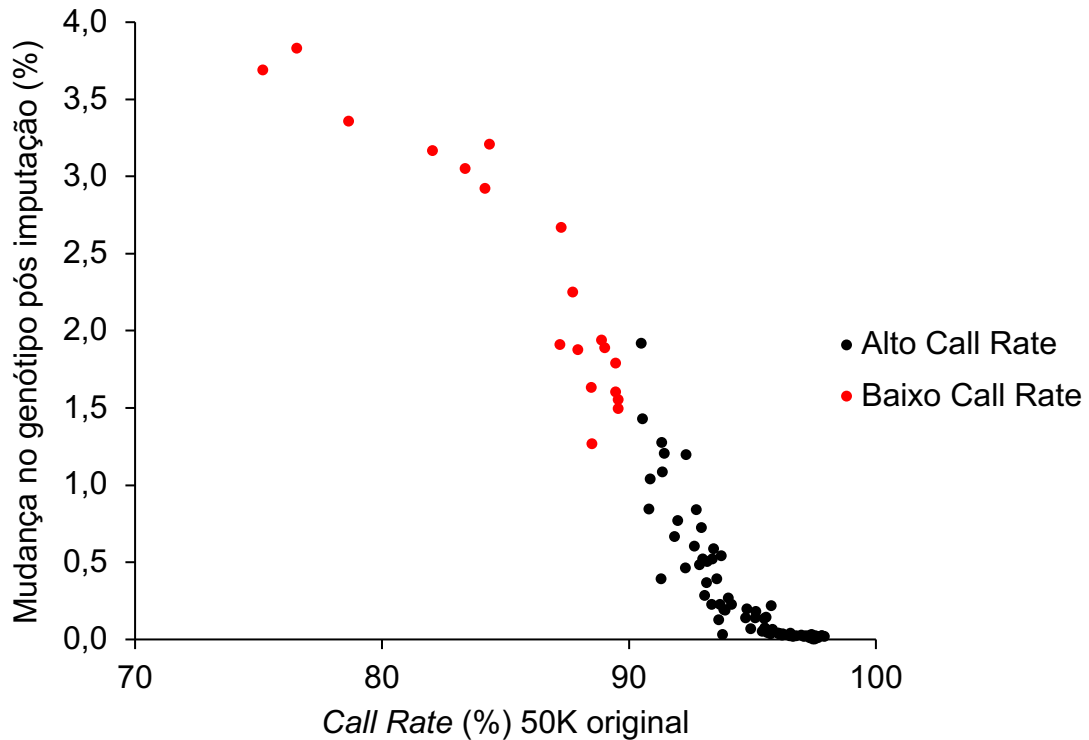


Fonte: o próprio autor.

Saadi et al. (2014) relataram em seu estudo que, ao acrescentarem informações genômicas parentais e da população de bovinos da raça Holandesa, houve melhoria na qualidade da imputação dos genótipos dos embriões, elevando o *call rate* em 100% e observando correção de 95% nas taxas de erro.

O grupo de embriões que apresentou baixo *call rate* teve, em média, 2,4% dos genótipos corrigidos após a imputação, sendo a média geral de correção com todos os embriões de 0,73%, com mínima de 0,0086% e máxima de 3,84% (Gráfico 4).

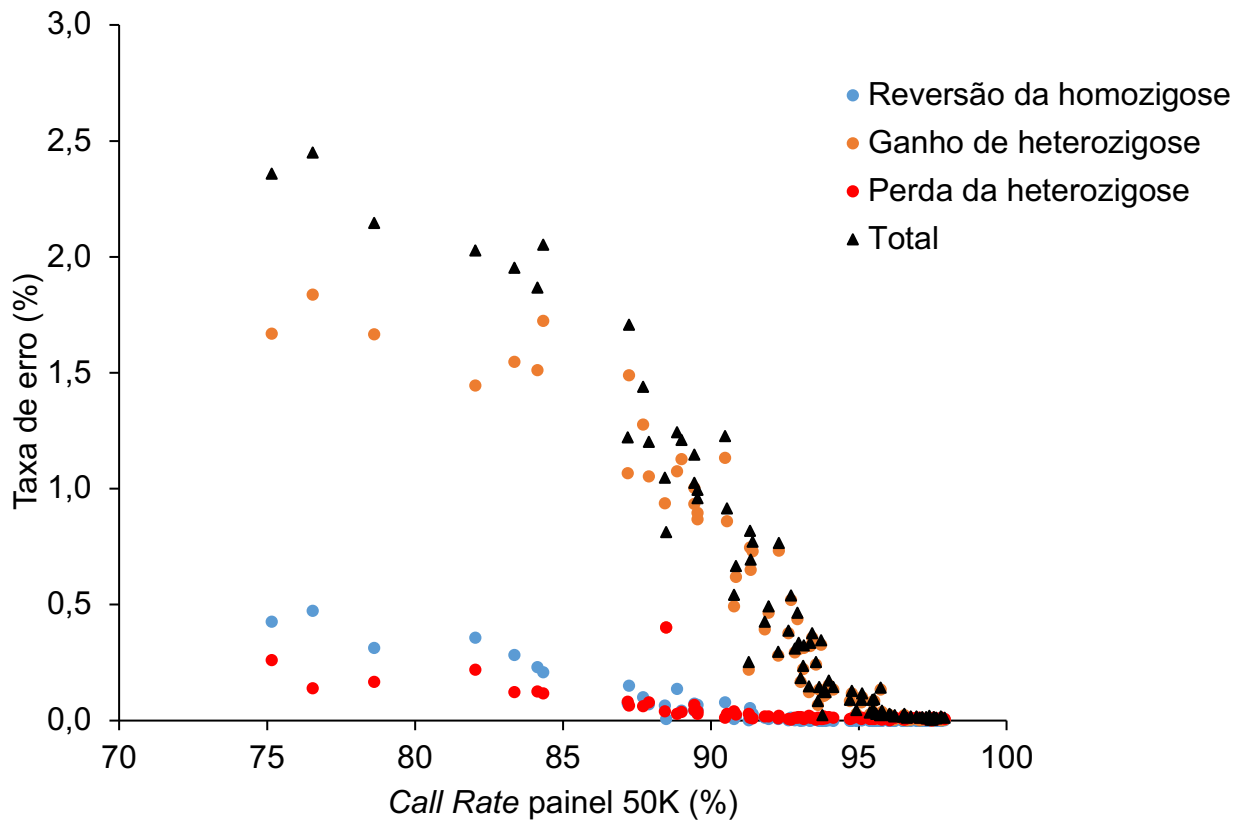
Gráfico 4 – *Call rate* dos genótipos 50K original dos embriões de bovinos da raça Nelore e nível de mudança nos genótipos após imputação para HD



Fonte: o próprio autor.

Após a imputação também ocorreu a correção dos SNPs, que consiste na retificação dos marcadores homozigotos que foram inicialmente denominados como heterozigotos ou homozigotos opostos. Essas alterações podem ser calculadas através da taxa de erro. Saadi et al. (2014) explicaram que a taxa de erro representa a proporção da leitura incorreta dos genótipos, resultando em eventos de *drop-out* (perda da heterozigosidade) ou *drop-in* (ganho em heterozigosidade e reversão da homozigose). No Gráfico 5 estão representadas a taxa de erro proveniente dos eventos de *drop-out*, *drop-in* e total de acordo com o *call rate* de cada amostra de embrião. É notável que conforme aumenta-se o *call rate*, reduz-se as correções realizadas nos genótipos, sendo que a taxa máxima de erro verificada por amostra foi de 2,45%.

Gráfico 5 – *Call rate* dos genótipos 50K dos embriões de bovinos da raça Nelore e taxa de erro após a correção proveniente da imputação



Fonte: o próprio autor.

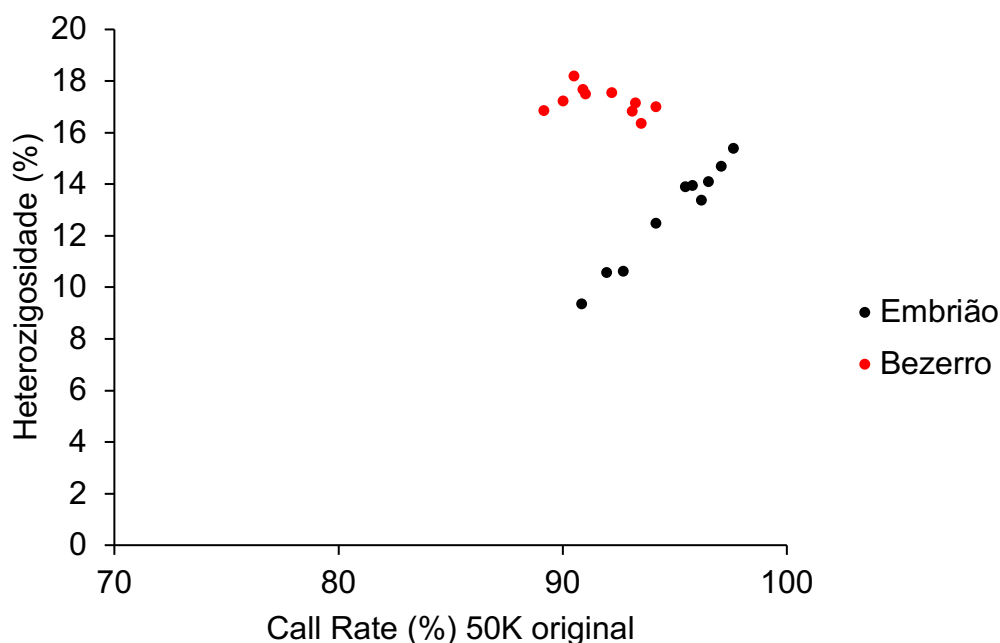
Fisher et al. (2002) e Saadi et al. (2014) **observaram** que o *call rate* e a taxa de erro dos genótipos são negativamente correlacionados, além de serem afetados pelo número de células oriundas da biópsia. Entre os problemas que podem ocorrer durante o processo de pré-amplificação enzimática, o mais comum é a perda de heterozigosidade, ou seja, somente um dos alelos heterozigotos (paterno ou materno) é pré-amplificado, levando a uma falsa leitura homozigótica nesse locus; além disso, a inserção de alelos (ganho de heterozigosidade) e reversão de homozigose raramente ocorrem (MULLAARTE, WELLS, 2018). Contudo, no presente estudo, os valores máximos observados de mudança foram maiores para o ganho de heterozigosidade (1,94%), seguido da reversão homozigótica (0,50%) e pela perda de heterozigosidade (0,40%).

Lauri et al. (2013) relataram *call rate* médio de 81,42% em seu estudo e constataram que as taxas de perda alélica (provenientes da amplificação desequilibrada do *loci* heterozigoto) e a inserção alélica (oriundas do aparecimento de

novos alelos em *loci* não polimórficos) foram maiores nas amostras que possuíam baixo *call rate*.

Após o nascimento, somente 10 bezerros foram genotipados com chip de 50K. O *call rate* de 50K originais desse grupo foi em média 95% (mínimo de 91% e máximo de 98%), e, quando embriões, o *call rate* foi de 92% (mínimo de 89% e máximo de 94%) (Gráfico 6). Observa-se no Gráfico 6 que a heterozigosidade dos embriões foi subestimada, provavelmente devido aos erros ocasionados pela amplificação e genotipagem do DNA embrionário.

Gráfico 6 – Call rate dos genótipos 50K original e heterozigosidade dos embriões e respectivos bezerros da raça Nelore



Fonte: o próprio autor.

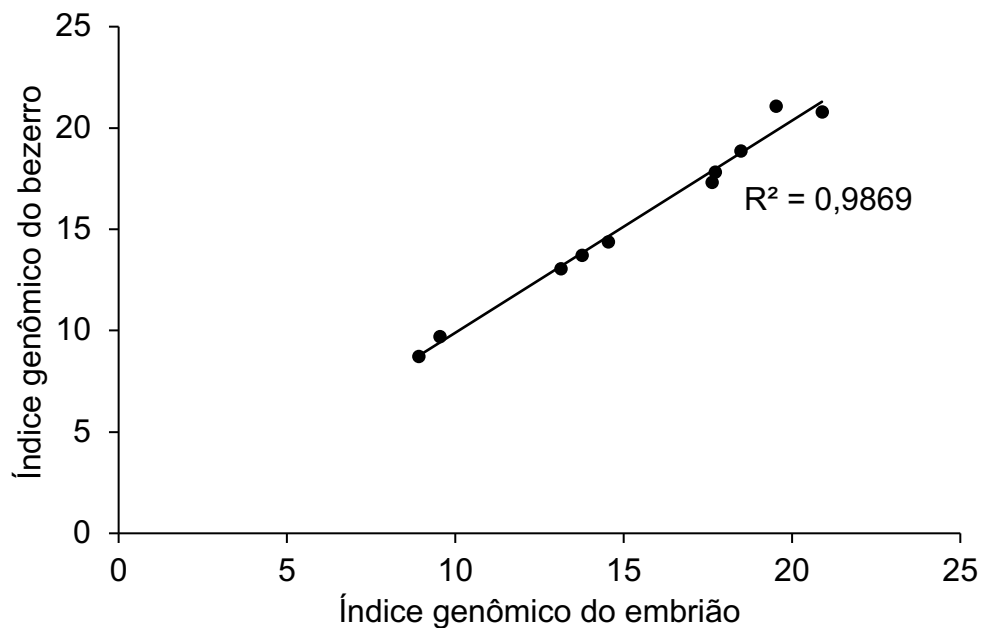
O nível de concordância entre os genótipos 50K dos pares embrião-bezerros variou de 80,78% a 91,33%. Já o nível de concordância entre os genótipos imputados por HD variou de 97,22% a 99,78%. Fujii et al. (2019) relataram taxa de concordância 100% entre os genótipos de embriões biopsiados e os genótipos dos bezerros correspondentes.

Todos os embriões tiveram os valores genéticos genômicos estimados, além do índice de seleção calculado de acordo com a metodologia utilizada pelo programa de melhoramento genético do qual a fazenda faz parte. A

média do índice de seleção calculada para todos os embriões foi de 11,25, com mínima de 4,54 e máxima de 20,06.

Os dez embriões selecionados posteriormente como bezerros apresentaram média do índice de 15,42, variando entre 8,91 e 20,89 (Gráfico 7), sendo a acurácia média de 58%. Para os respectivos bezerros, o índice médio foi de 15,56, com acurácia de 59%. A correlação observada entre os índices foi de 99,3%.

Gráfico 7 – Comparação entre o índice genético genômico estimados para os embriões e respectivos bezerros da raça Nelore



Fonte: o próprio autor.

Saadi et al. (2014) também obtiveram correlação de 99% entre os valores genéticos genômicos estimados nas amostras de embriões e os valores genéticos dos respectivos bezerros correspondentes. Assim, os resultados obtidos pelos autores e os reportados no presente estudo sugerem que as informações obtidas nos diferentes estágios de desenvolvimento estão altamente associadas.

Mullaart e Wells (2018) verificaram que a correlação entre os valores genéticos genômicos, calculados a partir da genotipagem dos embriões, e os valores genéticos correspondentes, determinados a partir de DNA de cada um dos bezerros resultantes, foi alta (95%) quando utilizados apenas genótipos com *call rate* igual ou superior a 85%, considerando a característica quilogramas de proteína do leite. No

entanto, quando foram incluídos animais com *call rate* inferior, a correlação decresceu para 71%. A menor correlação para amostras com baixo *call rate* era esperada, uma vez que menores taxas de leitura dos genótipos estão associadas a uma maior taxa de erro (MULLART, WELLS, 2018).

Fujii et al. (2019) realizaram os cálculos dos valores genéticos genômicos estimados (GEBVs) de 4.311 bovinos pretos japoneses para características de peso de carcaça, área de olho de lombo e marmoreio. As genotipagens foram realizadas utilizando chips contendo de 7 a 50K SNPs e os dados foram imputados, totalizando 34481 SNPs. Apenas amostras com *call rate* acima de 85% foram usadas para cálculo de GEBV, sendo as amostras com valores menores omitidas para evitar cálculos imprecisos de GEBV. Os autores observaram variações nos GEBVs para características de carcaça entre embriões de irmãos completos, para os quais, em uma avaliação genética tradicional, se espera que indivíduos jovens e sem informações fenotípicas apresentem os valores genéticos estimados próximos a média dos valores estimados para seus pais, e que irmãos completos possuam valores genéticos semelhantes. Para os autores, a possibilidade de distinguir a habilidade genética entre embriões de irmãos completos, no estágio de pré-implantação, por meio do uso de GEBVs, pode influir na eficiência produtiva de bovinos de corte. Mullaart e Wells (2018) também relataram a possibilidade de classificar os embriões provenientes de irmãos completos através dos valores genômicos estimados. Os autores observaram que uma amostra foi geneticamente superior para o quilo de leite produzido, quando comparado aos seus outros irmãos.

De acordo com Mullaart e Wells (2018), a seleção genômica promove aceleração do progresso genético, aumentando ainda mais a intensidade de seleção e reduzindo o intervalo de gerações, quando se utiliza animais jovens; ela também proporciona a seleção de embriões de maior mérito genético para serem transferidos, otimizando o uso de receptoras disponíveis e proporcionando ainda vantagens econômicas para o sistema de criação. Nesse sentido, novas possibilidades surgem a partir da seleção genômica de embriões.

Combinar tecnologias reprodutivas e genômicas é uma abordagem promissora que permite selecionar bovinos reprodutores de alta qualidade no menor tempo possível (PANTIUKH et al., 2019). Mullaart e Wells (2018) afirmaram que as empresas de reprodução estão utilizando cada vez mais a genotipagem de embriões

a fim de selecionar aqueles que possuem o maior mérito genético para transferência, principalmente nos programas de melhoramento genético de bovinos leiteiros.

VanRaden (2020) relatou que o banco de dados proveniente do desempenho de animais leiteiros nos Estados Unidos, pertencente ao *Council on Dairy Cattle Breeding*, contém milhares de genótipos de embriões, pois acredita-se que a seleção na fase de pré-implantação pode melhorar as taxas de progresso genético. Segundo o mesmo autor, os resultados gerados a partir dessas informações proporcionaria alta intensidade de seleção, porque somente os embriões com maior mérito genético seriam implantados. Entretanto, essa estratégia ainda não é acessível em rebanhos comerciais, em que os custos de transferência de embriões, perda de fertilidade e genotipagem excedem os ganhos de seleção (VANRADEN, 2020).

Um das questões do trabalho com embriões produzidos *in vitro* e biopsiados refere-se à sua sobrevivência e êxito na taxa de concepção, após a série de manipulações para a produção e genotipagem do material. No presente trabalho, a taxa de prenhez proveniente dos embriões biopsiados foi de 31%, valor semelhante ao do grupo controle (24%), indicando que a extração de DNA na fase embrionária não reduziu a viabilidade do embrião, além de os processos e cuidados com o material promoverem maior taxa de prenhez.

Andrade et al. (2012) avaliaram os fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro* e observaram que as receptoras, novilhas mestiças, apresentaram taxa de prenhez de 39,1% para embriões da raça Nelore. Sousa et al. (2017), ao compararem as taxas de prenhez entre embriões biopsiados produzidos *in vivo* ou *in vitro* com embriões não biopsiados, verificaram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os procedimentos. Os autores concluíram que a biópsia não afetou a capacidade do embrião de se desenvolver ou de se implantar normalmente nos bovinos leiteiros avaliados, sendo considerados fatores essenciais para o sucesso do desenvolvimento embrionário o método e o estágio para realização do procedimento.

Estudos relacionados com a qualidade e escolha dos embriões bovinos produzidos *in vitro* e melhorias das taxas de concepção e nascimentos são discutidos (MONTIEL et al., 2006; SUGIMURA et al., 2012; MELLO et al., 2016; HANSEN, 2020) e resultam em adequações a fim de tornar as técnicas mais seguras e economicamente viáveis. Por exemplo, Silvestre et al. (2021) avaliaram a utilização

de teste genético pré-implantação para aneuploidia, apontando taxa de prenhez de 52,1% para embriões sem teste genético, 59,6% para embriões classificados como euplóides e de 5,8% para embriões diagnosticados como cromossomicamente anormais. Assim, a identificação de anormalidades cromossômicas também refletiu nas taxas nascimentos, colaborando para um sistema mais econômico.

CONCLUSÃO

A genotipagem dos embriões biopsiados apresentou qualidade satisfatória, com 80% das amostras com *call rate* acima de 90%. O uso da imputação é recomendado para melhorar a qualidade da predição dos genótipos dos embriões, bem como aumentar a qualidade de todos os parâmetros avaliados.

Os valores dos índices de seleção calculados para os embriões e respectivos bezerros apresentaram alta correlação, sugerindo a possibilidade de se escolher os indivíduos geneticamente superiores ainda na fase embrionária.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, C A.; PETTERSSON, F. H.; CLARKE, G. M.; CARDON, L. R.; MORRIS, A. P.; ZONDERVAN, K. T. Data quality control in genetic case-control association studies. **Nature Protocols**, v. 5, n. 9, p. 1564–1573, 2010.

ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 66–69, 2012.

BOLORMAA, S.; PRYCE, J. E.; KEMPER, K.; SAVIN, K.; HAYES, B. J.; BARENDSE, W.; ZHANG, Y.; REICH, C. M.; MASON, B. A.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; REVERTER, A.; HERD, R. M.; TIER, B.; GRASER, H. U.; GODDARD, M. E. Accuracy of prediction of genomic breeding values for residual feed intake and carcass and meat quality traits in *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 7, p. 3088–3104, 2013.

CLAYTON, D. **snpStats**: SnpMatrix and XSnpmatrix classes and methods. R package version 1.38.0. 2020.

FISHER, P. J.; HYNDMAN, D. L.; BIXLEY, M. J.; OBACK, F. C.; POPOVIC, L.; MCGOWAN, L. T.; BERG, M. C.; WELLS, D. N. Potential for genomic selection of bovine embryos. In: New Zealand Society of Animal Production, 72., 2012, Christchurch. **Anais [...]**. Christchurch: NZSAP, 2012. p. 156–158.

FUJII, T.; NAITO, A.; HIRAYAMA, H.; KASHIMA, M.; YOSHINO, H.; HANAMURE, T.; DOMON, Y.; HAYAKAWA, H.; WATANABE, T.; MORIYASU, S.; KAGEYAMA, S. Potential of preimplantation genomic selection for carcass traits in Japanese black cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 3, p. 251–258, 2019.

FUJII, T. NAITO, A.; MORIYASU, S.; KAGEYAMA, S. Potential of preimplantation genomic selection using the blastomere separation technique in bovine *in vitro* fertilized embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 67, n. 2, p. 155–

159, 2021.

HANSEN, P. J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle - why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 11, p. 1–20, 2020.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. C.; VERBYLA, K.; GODDARD, M. E. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, n. 1, p. 51, 2009.

LAURI, A.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; LAGUTINA, I.; GENZINI, E.; BRAGA, F.; MARIANI, P.; WILLIAMS, J. L. Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies. **Genomics**, v. 101, n. 1, p. 24–29, 2013.

LU, D.; MILLER, S.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; VOORT, G. V.; CALDWELL, T.; WANG, Z.; PLASTOW, G.; MOORE, S. Genome-wide association analyses for growth and feed efficiency traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 8, p. 3612–3633, 2013.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUZA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58–54, 2016.

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.

MONTIEL, F.; GALINA, C.; RUBIO, I.; CORRO, M. Factors affecting pregnancy rate of embryo transfer in bos indicus and bos taurus/bos indicus cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 29, n. 2, p. 149–152, 2006.

MULLAART, E.; WELLS, D. Embryo Biopsies for Genomic Selection. *In*: NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. **Animal Biotechnology 2**. Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018. p. 81–94.

PANTIUKH, K. S.; RUKIN, I. V.; PORTNOV, S. M.; KHATIB, A.; PANTELEEV, S. L.; MAZUR, A. M. The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos. **Vavilov Journal of Genetics and Breeding**, v. 23, n. 4, p. 489–495, 2019.

PRYCE, J. E.; ARIAS, J.; BOWMAN, P. J.; DAVIS, S. R.; MACDONALD, K. A.; WAGHORN, G. C.; WALES, W. J.; WILLIAMS, Y. J.; SPELMAN, R. J.; HAYES, B. J. Accuracy of genomic predictions of residual feed intake and 250-day body weight in growing heifers using 625,000 single nucleotide polymorphism markers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 2108–2119, 2012.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.

SAADI, H. A. S.; VIGNEAULT, C.; SARGOLZAEI, M.; GAGNÉ, D.; FOURNIER, E.; MONTERA, B.; CHESNAIS, J.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2014.

SABINA, J.; LEAMON, J. H. Bias in Whole Genome Amplification: Causes and Considerations. In: KRONEIS, T. **Methods in Molecular Biology**. v. 1347. New York: Springer Science, 2015. p. 15–41.

SARGOLZAEI, M.; VANRADEN, P. M.; KISTEMAKER, G.; SCHENKEL, F.; CHESNAIS, J. **GBV User's Guide**. 2013.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.

SEABURY, C. M.; OLDESCHULTE, D. L.; SAATCHI, M.; BEEVER, J. E.; DECKER, J. E.; HALLEY, Y. A.; BHATTARAI, E. K.; MOLAEI, M.; FREETLY, H. C.; HANSEN, S. L.; YAMPARA-IQUISE, H.; JOHNSON, K. A.; KERLEY, M. S.; KIM, J.; LOY, D. D.; MARQUES, E.; NEIBERGS, H. L.; SCHNABEL, R. D.; SHIKE, D. W.; SPANGLER,

M. L.; WEABER, R. L.; GARRICK, D. J.; TAYLOR, J. F. Genome-wide association study for feed efficiency and growth traits in U.S. beef cattle. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–25, 2017.

SILVESTRI, G.; CANEDO-RIBEIRO, C.; SERRANO-ALBAL, M.; LABRECQUE, R.; BLODIN, P.; LARMER, S. G.; MARRAS, G.; TUTT, D. A. R.; HANDYSIDE, A. H.; FARRÉ, M.; SINCLAIR, K. D.; GRIFFIN, D. K. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Live Birth Rates with In Vitro Produced Bovine Embryos: A Blind Retrospective Study. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2021.

SOUSA, R. V.; CARDOSO, C. R. S.; BUTZKE, G.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 90, p. 25–31, 2017.

SUGIMURA, S.; AKAI, T.; HASHIYADA, Y.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; HIRAYAMA, M.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; KOBAYASHI, S.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; KOBAYASHI, E.; KONISHI, K.; IMAI, K. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

VANRADEN, P. M. Symposium review: How to implement genomic selection. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5291–5301, 2020.

WEBER, K. L.; THALLMAN, R. M.; KEELE, J.W.; SNELLING, W.M.; BENNETT, G.L.; SMITH, T.P.; MCDANELD, T.G.; ALLAN, M.F.; EENENNAAM, A.L.V.; KUEHN, L.A. Accuracy of genomic breeding values in multibreed beef cattle populations derived from deregressed breeding values and phenotypes. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 4177-4190, 2012.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas e a crescente contribuição proveniente das informações genômicas, o melhoramento genético animal torna-se uma ferramenta cada vez mais eficiente na identificação de indivíduos jovens e com desempenho produtivo acima da média. A seleção e uso desses animais contribui para o aumento da variabilidade genética do rebanho, melhoria dos índices produtivos e a redução com os custos de produção, que estão relacionados ao uso de animais com baixo desempenho produtivo ou reprodutivo ou com avaliações de características de importância econômica mensuradas tardiamente.

Esse trabalho buscou contribuir para o melhoramento genético de bovinos da raça Nelore, utilizando informações derivadas dos marcadores moleculares e das biotecnologias aplicadas na área da reprodução, por meio dos estudos relacionados com a identificação da paternidade dos animais e a avaliação genética genômica de indivíduos, a partir de informações coletadas ainda na fase embrionária. Assim, verificou-se que, por meio do acréscimo das informações genotípicas, houve sucesso na identificação da paternidade a partir da inclusão de 206 marcadores ao painel ISAG existente. Além disso, atestou-se a possibilidade de selecionar indivíduos geneticamente superiores, ainda na fase embrionária.

Diante dos resultados, acredita-se que é possível complementar as duas pesquisas realizadas, atribuindo outras avaliações relacionadas ao impacto do uso de diferentes painéis de marcadores moleculares para teste de paternidade, na qualidade da avaliação genética dos animais, bem como na viabilidade de realizar a imputação desses painéis para painéis de maiores densidade. Ademais, em ambos os estudos é interessante aumentar o tamanho da amostra a ser avaliada, principalmente na vertente de avaliação genômica de embriões biopsiados, acompanhando um número maior de embriões e seu respectivo desenvolvimento pós-natal, para melhor representatividade da população Nelore e confiabilidade das análises.