UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LILIAN REGINA DA SILVA

**Impactos do reconhecimento de paternidade na avaliação genética de animais da raça
Nelore**

Pirassununga

2015

LILIAN REGINA DA SILVA

**Impactos do reconhecimento de paternidade na avaliação genética de animais da raça
Nelore**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências do programa de pós-
graduação em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

S586i Silva, Lilian Regina da
Impactos do reconhecimento de paternidade na avaliação
genética de animais da raça Nelore / Lilian Regina da
Silva. -- Pirassununga, 2015.
80 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Biociência Animal.
Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz.

1. Nelore 2. Polimorfismo de nucleotídeo único
3. Paternidade 4. Acurácia 5. Conflito de seleção.
I. Título.

*Aos meus amados pais, Antonio e Edna, que me ensinaram os valores da vida; à minha irmã,
Larissa, que amo incondicionalmente e à minha família, dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, que guiou os meus passos e a Nossa Senhora que intercedeu por mim.

Aos meus pais, irmã e família que tiveram a paciência de entender a minha ausência e que sempre me apoiaram com muito amor.

Aos meus avós por me mostrarem o valor da família e que o tempo passa rápido.

Ao Lucas pela compreensão e apoio durante esses anos.

Aos meus amigos, que superaram a distância.

Aos novos amigos que fiz no caminho.

Ao Prof. Dr. José Bento, pela amizade, orientação e oportunidade para que esse trabalho pudesse ser realizado. Sem esse apoio nada disso seria possível.

Ao Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia por me receber. À Elisângela pela amizade, paciência e por me socorrer durante as minhas visitas corridas. Ao Prof. Joanir pelo apoio e colaboração. Ao Gerson Júnior pela ajuda e aos demais que direta ou indiretamente convivi nesse tempo.

À família Neogen, que me ajudou e apoiou.

À Agro-Pecuária CFM Ltda. por disponibilizar os dados aqui analisados.

À Universidade de São Paulo, que por meio da FZEA proporcionou a realização desse trabalho.

A todos aqueles que por ventura não tenham sido citados e que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho fica aqui meu sincero agradecimento.

When you make things simple, you can move mountains.

Steve Jobs

We just decided to go.

Jim Lovell

RESUMO

SILVA, L. R. da **Impactos do reconhecimento de paternidade na avaliação genética de animais da raça Nelore**. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Em um cenário em que a qualidade da informação é essencial para a sustentação do processo de gestão do sistema ou do processo de seleção animal, corretas atribuições de paternidade se tornam importante para a manutenção das informações de pedigree e, conseqüentemente, para a estimativa dos valores genéticos dos animais em programas de seleção. Com o advento do uso de marcadores moleculares do tipo SNP na seleção genômica e em diferentes painéis de teste de parentesco, maiores estudos se fazem cada vez mais necessários. Dessa maneira esse estudo buscou analisar os ganhos em acurácia dos valores genéticos para características produtivas em um cenário de seleção real entre avaliações genéticas que continham ou não animais com atribuições de paternidade por teste de DNA e além disso, verificar os possíveis conflitos de seleção entre elas. Como resultados foram encontrados ganhos em acurácia principalmente em animais mais jovens, mas de maneira geral todos os animais foram beneficiados e apresentaram ganhos acima de 8% os animais diretamente submetidos ao teste. Conflitos de seleção variaram entre 14 a 52% quando considerada somatória das diferenças de seleção nas duas avaliações genéticas, mostrando também, que existiu uma alteração na ordem de classificação dos animais nas características analisadas. Como o fator custo é um ponto importante quando se fala em avaliação genética e tudo que envolve a nova fase dos marcadores moleculares, um painel de paternidade eficiente é aquele que apresenta o melhor desempenho na determinação da paternidade sob um menor custo. Dessa forma, foram comparados alguns grupos de marcadores e o painel de 195 SNP proposto pelo grupo ISAG se mostrou eficiente, assim como outros, na determinação de paternidade em um grupo específico de animais. Os resultados deste trabalho indicam também que o teste de parentesco por DNA é uma ferramenta que pode aumentar a precisão do arquivo pedigree por aumentar a conexão dos animais, ou seja, por criar maiores ou mais laços genéticos entre os indivíduos. Assim, poder-se-ia melhorar o desempenho da avaliação genética em um programa de melhoramento genético bovino através de pequenos grupos de marcadores moleculares com um custo-benefício atrativo.

Palavras-chave: Nelore; Polimorfismo de nucleotídeo único; paternidade; acurácia, conflito de seleção

ABSTRACT

SILVA, L. R. da. **Impacts of parentage identification in the genetic evaluation of Nellore animals**. 2015. 80 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

In a scenario where information quality is essential to support a process management system or an animal selection process, correct paternity assignments become important for maintaining pedigree information and hence to estimate animals genetic values in breeding programs. With the advent of the use of SNP molecular markers in genomic selection and different kinship test panels, larger studies are increasingly necessary. Thus, this study investigated the gains in accuracy of breeding values for production traits (in a real selection scenario) between the genetic evaluations of animals with or without parenting assignment by DNA testing. It also verified possible selection conflicts between them. The following results showed gains in accuracy, especially in younger animals. However, in general, all animals benefited having gains greater than 8% where animals were directly impacted. Checking conflicts ranged from 14-52% when the sum of the differences of selection in both genetic evaluations was considered. This also showed that there was a change in the ranking of animals in the analyzed characteristics. As cost is also an important factor in genetic evaluations using new molecular markers, an effective parenting panel would be one that had the best performance in the paternity determination under a lower cost. Therefore, we compared some small marker groups and the 195 SNP panel proposed by ISAG group and determined this was efficient in estimating paternity on a specific group of animals. These results also suggest that kinship testing by DNA is a tool that can increase the accuracy of the pedigree file to increase the animals' connection, or to create larger or more genetic links between individuals. This study shows that testing with small groups of molecular markers improves the performance of genetic evaluation in a bovine genetic selection program with an attractive cost-benefit.

Keywords: Nellore; Single Nucleotide Polymorphisms; paternity; accuracy, conflict selection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Bezerro da raça Nelore	21
Figura 2	Mensuração de perímetro escrotal com fita métrica	22
Figura 3	Representação esquemática das diferentes proporções que devem ser avaliadas pelas características conformação (E), precocidade (P) e musculosidade (M=MUSC)	23
Figura 4	Impacto de acurácia expressa em porcentagem de incremento para características produtivas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculosidade, pontos) considerando os grupos de reprodutores e matrizes.....	44
Figura 5	Impacto de acurácia expressa em porcentagem de incremento para características produtivas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculosidade, pontos) considerando os grupos de produtos machos e fêmeas.....	45
Figura 6	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de circunferência escrotal (CE) com linha de truncamento dos 20% melhores machos	48
Figura 7	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de ganho de peso pós-desmama (GP = GSOB) com linha de truncamento dos 20% melhores machos	49
Figura 8	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de escore de musculatura (MUSC) com linha de truncamento dos 20% melhores machos	49
Figura 9	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de peso a desmana (PESDES) com linha de truncamento dos 20% melhores machos	50

Figura 10	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de ganho de peso pós-desmama (GP = GSOB) com linha de truncamento das 20% melhores fêmeas50
Figura 11	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de escore de musculatura (MUSC) com linha de truncamento das 20% melhores fêmeas51
Figura 12	Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de peso a desmana (PESDES) com linha de truncamento das 20% melhores fêmeas51
Figura 13	Gráfico de porcentagem de animais cujos touros qualificados como pais foram ou não determinados igualmente aos pais do pedigree66
Figura 14	Gráfico de porcentagem de animais cujos touros não qualificados como pais foram ou não determinados igualmente aos pais do pedigree67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatísticas descritivas para as características analisadas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculabilidade, pontos)43
Tabela 2	Distribuição de bezerras por safra de nascimento e sexo43
Tabela 3	Porcentagem de conflitos de seleção para produtos machos e fêmeas da safra 2011 nas quatro características produtivas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculabilidade, pontos) e considerando 3 diferentes pontos de corte de seleção (10, 20 e 30%)53
Tabela 4	Combinação dos diferentes grupos de marcadores para a formação dos painéis analisados nos testes de paternidade62
Tabela 5	Porcentagem de animais de acordo com a designação do touro sugerido como pai65

LISTA DE SIGLAS

ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BIF	<i>Beef Improvement Federation</i>
BLUP	Melhor Predição Linear Enviesada (<i>Best Linear Unbiased Predictor</i>)
CAR	Consumo alimentar residual
CE	Circunferência escrotal (Perímetro escrotal) aos dezoito meses de idade
CEPEA	Centro de estudos avançados em economia aplicada
CV	Componente de variância
DEP	Diferença esperada na progênie
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EA	Eficiência alimentar
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GC	Grupo de contemporâneo
GMAB	Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologias
GSOB	Ganho de peso pós-desmame em 345 dias
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBD	Idênticos por descendência
ISAG	Sociedade Internacional de Genética Animal (<i>International Society for Animal Genetics</i>)
MAX	Valor máximo encontrado
MIN	Valor mínimo encontrado
MME	Equação de Modelo Misto (<i>Mixed Model Equation</i>)
MN	Monta natural
MS	Microsatélite
MTDFREML	<i>Multiple Trait Derivative-Free Restricted Maximum Likelihood</i>
MUSC	Escore visual de musculabilidade aos dezoito meses de idade
N	Número de indivíduos
NRM	<i>Numerator Relationship Matrix</i>
PESDES	Peso a desmama

PIB	Produto interno bruto
PTA	Habilidade de transmissão predita (<i>Predicted transmitting ability</i>)
R	Programa de pacotes de análises estatísticas
REML	Máxima Verossimilhança Restrita (<i>Restricted Maximum Likelihood</i>)
RM	Reprodutor múltiplo
SNP	Polimorfismo de base única (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
SQNM	Sequenom
STR	Microsatélite (<i>Short Tandem Repeats</i>)
TM	Touro múltiplo
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESE	18
3 OBJETIVOS	19
4 REVISÃO	20
4.1 Panorama da pecuária de corte brasileira	20
4.2 A raça Nelore	20
4.3 Programa de melhoramento genético	21
4.4 Manejo reprodutivo	23
4.5 Teste de paternidade	25
4.6 Marcadores SNP	26
4.7 Avaliação Genética	28
5 REFERÊNCIAS	31
6 IMPACTOS DO RECONHECIMENTO DE PATERNIDADE NA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE ANIMAIS DA RAÇA NELORE DE UMA FAZENDA COMERCIAL	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
6.1 INTRODUÇÃO	37
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	39
6.2.1 Animais e banco de dados	39
6.2.2 Genotipagem e Teste de Parentesco	40
6.2.3 Avaliação genética	40
6.2.4 Conflitos de seleção	42
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.4 CONCLUSÃO	54
6.5 REFERÊNCIAS	54
7 COMPARAÇÃO DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE PAINÉIS DE SNP PARA REALIZAÇÃO DE TESTE DE PATERNIDADE	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
7.1 INTRODUÇÃO	58
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS	60
7.2.1 Animais e banco de dados de genótipos	61

7.2.2 Painéis para o teste de paternidade.....	61
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
7.4 CONCLUSÃO	69
7.5 REFERÊNCIAS	70
8 SUGESTÕES.....	73
ANEXO A: Lista de marcadores SNP utilizados do painel ISAG Core.....	75
ANEXO B: Lista de marcadores SNP utilizados do painel ISAG Additional.....	78

1 INTRODUÇÃO

A produção animal sofreu uma grande mudança em direção à intensificação nos últimos anos. A pecuária tornou-se cada vez mais dinâmica e a informação cada vez mais valiosa e indispensável para uma gestão eficiente do sistema, onde fatores de determinação genética ligados à produção e reprodução interferem diretamente nos resultados. O empreendimento rural assume um perfil altamente profissional, que busca retornos econômicos para que consiga garantir sua presença no mercado cada vez mais competitivo, ou seja, a sustentabilidade financeira da operação. Assim, o melhoramento genético de animais de exploração econômica constitui-se num insumo essencial para a pecuária moderna.

A bovinocultura de corte brasileira destaca-se pela produção extensiva de animais, especialmente da raça Nelore, que são mantidos em regime de pastagens (MILLEN et al., 2011). No Brasil, segundo estimativas aproximadas, apenas 11.9% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas (ASBIA, 2012). Com base nesse valor, 88.1 % dos acasalamentos entre bovinos utilizam a monta natural (MN). Entretanto, esta proporção apresenta uma tendência de decréscimo em função do crescimento da utilização da técnica de inseminação artificial, em especial devido à forte expansão da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), onde esse crescimento foi 23,55% do ano de 2010 para 2011 e sobre esse, ainda houve um crescimento de 3,64% em 2012 (ASBIA, 2012).

Mesmo com o advento do uso e conhecimento dos benefícios dessas duas tecnologias, os touros continuam sendo utilizados de maneira maciça na maior parte dos rebanhos ou no repasse das matrizes não prenhes após as inseminações. Na produção de bovinos de corte os touros utilizados em monta natural nem sempre trabalham individualmente nos lotes de vacas, ou seja, por conta das divisões e formações das pastagens e até mesmo do sistema de manejo adotado, o pecuarista tem a necessidade de organizar grandes lotes de animais e com isso, vários touros são colocados proporcionalmente em um mesmo lote de matrizes para garantir a qualidade dos resultados de prenhez, num sistema que é denominado reprodutor múltiplo (RM) ou touro múltiplo (TM).

Um problema associado ao manejo dos grupos de RMs é que a paternidade dos bezerros nascidos não pode ser determinada, a menos que se utilize a técnica de genotipagem com utilização da informação molecular (HEYEN et al., 2009; VANKAN; FADDY, 1999).

Para alcançar uma execução eficiente dos programas de melhoramento é necessário minimizar os erros de genealogia e atribuir um correto parentesco entre os animais na

população, pois segundo alguns estudos uma queda de 2,5 a 15% no ganho genético podem ocorrer em populações com 7 a 15% de erros de paternidade (WOODWARD; LENDE, 2008). Contudo, as proporções de erros nos pedigrees variam em diferentes países de 5 a 23% e as razões podem ser resumidas em erros na identificação das palhetas de sêmen, na manipulação da palheta pelo inseminador, na inseminação de vacas já prenhes, na escrituração do manejo de inseminação, no diagnóstico de vaca prenhe da inseminação, quando na verdade a prenhez é devida ao touro, nas trocas internas de bezerros na fazenda e por fim, nos erros de genotipagens ou a ocorrência dos chamados “*null alleles*” que podem levar à uma rejeição errada do correto parentesco (ADAMOV, 2011).

A proporção de animais sem a paternidade conhecida nas fazendas é muito variável, mas mesmo em grandes programas de melhoramento esse valor pode chegar a proporções de 50% no conjunto total de dados e isso acarreta em sub ou superestimação dos valores genéticos, principalmente se estiverem presentes em grupos de contemporâneos (GCs) desconectados, ou seja, com poucas ligações genéticas, além dos problemas nas estimações de componentes de variância que podem ser gerados (BRITO, 2006).

Falhas nas informações de parentesco podem causar viés e introduzir erros nas avaliações genéticas, causando um impacto negativo sobre elas e nas estimativas de consanguinidade, herdabilidade e valores genéticos. Assim, as verificações de parentesco podem servir como uma valiosa ferramenta em programas de melhoramento genético (RON et al., 1996; POLLAK, 2005; JAKHESARA et al., 2012).

O modelo *Best Linear Unbiased Prediction* (BLUP, traduzido como Melhor Predição Linear Enviesada) presume que a população base é uma amostra de animais não selecionados com uma distribuição normal de média zero e variância igual à variância genética, requerendo um adequado conhecimento do rebanho onde essas predições serão estudadas (HENDERSON, 1977). Com isso, a ausência de informações referentes à genealogia do animal gera predições tendenciosas dos valores genéticos assim como da tendência genética (PHOCAS; LALOË, 2004), principalmente para animais sem ou com poucas informações de progênies.

Tradicionalmente, o progresso genético na pecuária tem se restringido à seleção com base no fenótipo. O delineamento de teorias quantitativas e metodologias para uma acurada seleção e predição de respostas genéticas dominou o século passado, o que resultou na seleção de importantes características econômicas em bovinos, ovinos, suínos e aves. Nos últimos 25 anos, os marcadores de DNA associados a diferentes técnicas têm criado novas possibilidades de melhoramento genético, conservação da biodiversidade e resistência a doenças em animais e plantas. Nos últimos 15 anos, com avanço das técnicas de marcadores moleculares, isso tem

se tornado uma importante estratégia. O advento dos protocolos de biologia molecular, durante as três últimas décadas, tem criado novos significados e possibilidade para estudos genéticos e seleção com base no genótipo (SABIR et al., 2014).

Buscando solucionar ou diminuir parte desses problemas de perda ou correção da informação de paternidade, testes que buscam a identificação desse parentesco com o uso do DNA (ácido desoxirribonucleico) estão se tornando cada vez mais presentes.

2 HIPÓTESE

O reconhecimento da paternidade de animais causa alteração na predição dos valores genéticos de toda a população, bem como, alterações em suas acurácias.

3 OBJETIVOS

Tendo em vista que a identificação de paternidade dos animais filhos de RM (reprodutor múltiplo), ou melhor, filhos de pais não definidos, aumenta os laços genéticos, dando uma maior robustez para as predições genéticas e, conseqüentemente, contribui para uma maior acurácia das estimativas dos valores genéticos aditivos, este projeto destina-se a verificar primeiramente as diferenças de contribuições da utilização dessa ferramenta nas acurácias de valores genéticos preditos e os possíveis conflitos de seleção, ou seja, comparar a proporção de animais que seriam selecionados pela avaliação genética sem o reconhecimento de paternidade, filhos de RM, com a aquela onde animais tiveram paternidade reconhecida. Para isso foram consideradas características produtivas utilizadas em um cenário real, ou melhor, do índice de seleção de um programa de melhoramento genético comercial. Além disso, visando uma futura substituição de tecnologia na formação e seleção de painéis de marcadores, esse estudo também comparou diferentes possíveis painéis de SNPs, no intuito de verificar e identificar os corretos pais aos animais testados da raça Nelore para uso comercial ou mesmo dentro de um processo de seleção genômica de um grupo de melhoramento específico.

4 REVISÃO

4.1 Panorama da pecuária de corte brasileira

A produção animal e a indústria da carne representam um importante setor da economia brasileira, pois têm participação na formação do produto interno bruto e, além disso, é um dos itens mais importantes na dieta alimentar mundialmente.

Segundo o relatório PIB Agro CEPEA-USP/CNA publicado em Dezembro de 2014, em 2015 o agronegócio pode ser o grande condicionante do desempenho da economia nacional. Representando 23% do PIB brasileiro, ele pode ser o único setor com crescimento mais expressivo, dado que muitos segmentos da indústria não conseguem avançar e os serviços estão em processo de exaustão. Estimativas do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), da Esalq/USP, apontam que no ano de 2015 o agronegócio pode crescer 2,8%.

Pelo balanço da pecuária de corte o Brasil possui 167 milhões de hectares de pasto, com uma taxa de lotação média de 1,23 cabeças/hectare e um rebanho de 208,3 milhões de cabeças (ABIEC, 2014). Segundo a mesma Associação, o setor movimentou em 2010 em toda a cadeia produtiva US\$ 167,5 bilhões, sendo que aproximadamente 19% foram movimentados nas fazendas, ou seja, com animais no sistema de produção e quase 1% foi destinado ao segmento de genética.

O rebanho bovino brasileiro está em plena evolução e com uma melhoria contínua dos seus índices zootécnicos, através de um melhor controle e gerenciamento da informação, o que está lhe garantindo se tornar cada dia mais produtivo e eficiente. A maior e melhor produção em área constante têm permitido que a pecuária brasileira se torne cada vez mais sustentável e uma referência no mundo inteiro.

4.2 A raça Nelore

A história da raça de gado bovino Ongole, ou Nelore, como é conhecida no Brasil, começa mil anos antes da era cristã, quando os arianos levaram os animais para o continente indiano. Nelore é o nome de um distrito da antiga Província de Madras, Estado de Andra, situada na costa oriental da Índia, onde foram embarcados os primeiros animais para o Brasil (ACNB, 2015).

O primeiro registro de entrada do Nelore no Brasil aconteceu em 1868, com a chegada de um casal de animais a Salvador/BA de onde foi se expandindo aos poucos. Em 1938, foi criado o Registro Genealógico e desta maneira começaram a se definir as características raciais do Nelore. E embora tenha sido inicialmente utilizada para a exploração de leite, a raça Nelore, melhorada geneticamente no Brasil, está voltada para a produção de carne (LUCHIARI FILHO, 2006).

De temperamento ativo, dócil e com características funcionais que o adaptassem bem às condições tropicais brasileiras, como a rusticidade, o Nelore (Figura 1) foi ganhando cada vez mais espaço no território nacional. Atualmente, cerca de 80% do rebanho é composto por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) e dentre estas raças, a Nelore participa em 90% desta parcela (ABIEC, 2015).

Figura 1 - Bezerro da raça Nelore.

Fonte: BLOG DO NELORE, 2012.

Como exemplificado na Figura 1, a criação destes animais é predominantemente a pasto, com suplementação mineral. O uso de suplementação proteico/energética estratégica, de consumo reduzido, vem aumentando a cada dia, suprimindo a carência de nutrientes nos pastos durante o período “seco” do ano.

O Nelore brasileiro, além de ser considerado hoje como um patrimônio legitimamente nacional, produz carne com qualidade, exportada para mais de 146 países e cada vez mais demandada por consumidores esclarecidos do mundo todo (BEEFPOINT, 2015).

4.3 Programa de melhoramento genético

Cresce constantemente o interesse de produtores e empresários rurais por ferramentas que tragam aumento produtivo ao sistema, sejam elas, nutricionais, aplicadas diretamente ao manejo animal, reprodutivas e também genéticas. Quando a genética é o objetivo focado, o pecuarista recorre pela utilização de animais provenientes de programas de seleção que condizem com os seus objetivos, ou então, ele passa a integrar ou gerenciar um programa na propriedade.

Como exemplo de um programa de melhoramento genético, destaca-se aqui a Agropecuária CFM, proprietária do seu programa de seleção e dos dados utilizados nesse trabalho.

Para atingir os seus objetivos de seleção, a Agropecuária CFM, faz uso das seguintes características como critérios de seleção e de acordo com as descrições fornecidas no Sumário Anual de Touros publicado pela própria empresa:

- **Circunferência escrotal (CE, cm):** DEP calculada com base na medida tirada ao redor dos 18 meses de idade, com auxílio de fita métrica graduada em centímetros, a qual envolve a parte mais larga do saco escrotal (Figura 2). De moderada a alta herdabilidade, com valores variando de 0,32 a 0,57 (BOLIGON; CARVALHEIRO; ALBUQUERQUE, 2012; ELER et al., 2004), é uma característica de fácil mensuração e baixo custo de obtenção e que apresenta correlação moderada com a característica precocidade sexual em fêmeas (ELER et al., 2004), que por sua vez é trabalhosa e de alto custo de mensuração.

Figura 2 - Mensuração de perímetro escrotal com fita métrica.

Fonte: LÔBO, 2001 apud OLIVEIRA JÚNIOR, 2013.

- **Ganho de peso da desmama ao sobreano (GSOB, kg):** A DEP expressa o potencial de ganho de peso no período pós desmama do animal, ou seja, da desmama até o sobreano (18 meses de idade). É uma característica importante por representar o período mais

próximo da terminação do animal e expressar a velocidade de ganho de peso do animal, o que passa a ser importante para confinadores também.

- **Musculosidade (MUSC, un):** DEP baseada em escores de avaliação visual, realizada por um técnico devidamente treinado, com notas variando de 1 a 6 pontos (números inteiros). São observadas e avaliadas as evidências de massa muscular em pontos como antebraço, paleta, lombo, garupa e traseiro, como exemplificado na Figura 3. Segundo Koury Filho et al. (2010) é uma importante ferramenta e critério de seleção para aumentar a eficiência econômica dos rebanhos, possibilitando a identificação de indivíduos geneticamente superiores. Sendo assim, uma característica interessante para a obtenção de animais com biotípos mais adequados à indústria da carne.

Figura 3 - Representação esquemática das diferentes proporções que devem ser avaliadas pelas características conformação (E), precocidade (P) e musculosidade (M=MUSC).

Fonte: KOURY FILHO, 2005.

- **Peso a desmama (PEDES, Kg):** DEP calculada com base no peso obtido ao redor de 205 dias de idade, ela reflete o potencial de ganho de peso do animal, independente da produção de leite de sua mãe, ou seja, a ação direta dos genes do próprio indivíduo. Esta característica é importante para os produtores de bezerros e contribui na primeira fase de seleção dos animais.

4.4 Manejo reprodutivo

A bovinocultura de corte brasileira destaca-se pela produção extensiva de animais, especialmente da raça Nelore, que são mantidos em regime de pastagens (MILLEN et al., 2011). Como mencionado anteriormente, se no Brasil apenas 11,9% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas, 88,1% dos acasalamentos entre bovinos utilizam a monta natural (MN). Entretanto, esta proporção apresenta uma tendência de decréscimo em função do crescimento da utilização da técnica de inseminação artificial (IA), que de 2009 a 2014 obteve uma evolução de +58,5% no segmento de corte e +33,8% no leite (ASBIA, 2014).

No delineamento de um programa de melhoramento genético, uma das principais decisões é a escolha de quais animais permaneceram e quais serão descartados, seguindo pela estratégia de como serão utilizados na reprodução.

Mesmo com o advento do uso e conhecimento dos benefícios da tecnologia da IA, os touros continuam sendo utilizados de maneira maciça na maior parte dos rebanhos ou no repasse das matrizes não prenhes após o período de IA ou IATF (inseminação artificial em tempo fixo).

Mas na produção de bovinos de corte os touros utilizados em monta natural nem sempre trabalham individualmente nos lotes de vacas, ou seja, por conta das divisões e formações das pastagens e até mesmo do sistema de manejo adotado, o pecuarista tem a necessidade de organizar grandes lotes de animais e com isso, vários touros são colocados proporcionalmente em um mesmo lote de matrizes para garantir a qualidade dos resultados de prenhez, num sistema que é denominado de reprodutores múltiplos (RM) ou touros múltiplos (TM).

Segundo Cardoso et al. (2003), a formação de RMs pode ser uma das aplicações de análises de conglomerados (“clusters”) em melhoramento animal, procedimento multivariado que agrupa características raciais, funcionais ou produtivas similares, que trazem, além da maior produção concentrada de animais superiores, benefícios de manejo, reprodutivos e econômicos.

Contudo, para animais que fazem parte de um programa de seleção, a utilização dessa estratégia de RM não é satisfatória, uma vez que os animais nascem sem a precisão na informação de paternidade. Isso faz com que a predição dos valores genéticos destes animais sem relação genética com o rebanho seja prejudicada (FERRAZ; ELER, 1999) com prejuízos no cálculo das acurácias (PEREZ-ENCISO; FERNANDO, 1992), além de subestimar os valores de herdabilidade (VAN VLECK, 1970).

A proporção de animais sem a paternidade conhecida nas fazendas é muito variável, mas mesmo em grandes programas de melhoramento esse valor pode chegar a proporções de 50% no conjunto total de dados e isso acarreta em sub ou superestimação dos valores genéticos, principalmente se estiverem presentes em grupos de contemporâneos (GCs) desconectados, ou

seja, com poucas ligações genéticas, além dos problemas nas estimações de componentes de variância que podem ser gerados (BRITO, 2006).

4.5 Teste de paternidade

Tradicionalmente, fazendeiros e criadores têm contado com informações de acasalamento e nascimento para determinar os pais dos animais. Contudo, o controle dos acasalamentos nem sempre é possível ou é demorado, e a dedução de um dado preciso de pedigree pode ser inconclusiva e rompida pela prática de manejo da fazenda (FISHER et al., 2009). Um eficiente meio de identificação *a posteriori* permite um sistema de acasalamento flexível com a utilização de um “mix” de reprodutores, os RMs. (BOICHARD; BARBOTTE; GENESTOUT, 2014).

Em rebanhos comerciais, que utilizam as estratégias de RMs, a falta de atribuição de paternidade aos bezerros nascidos é um problema associado e que dificulta a determinação do número de progênes e/ou o desempenho produtivo de cada reprodutor. Essa é uma questão que não pode ser solucionada a menos que se utilize a técnica de genotipagem com utilização da informação molecular (HEYEN et al., 2009; VANKAN; FADDY, 1999).

Ron et al. (1996) estimaram um aumento de mais de US\$ 2 milhões em 20 anos, apenas aumentando a eficiência das informações de pedigree de raças de bovinos.

Há algum tempo se vem discutindo as diferentes formas e metodologias para a utilização do DNA na produção animal. E o seu uso pode positivamente contribuir para o aumento da acurácia da informação de pedigree (KIOS; MARLE-KÖSTER; VISSER; 2012).

O teste de paternidade se torna importante com a difusão do uso da técnica de inseminação artificial, transferência de embrião e pelo uso dos grupos de RMs. (KIOS; MARLE-KÖSTER; VISSER; 2012). E em testes de progênie, onde os custos são altos e com um grande intervalo de geração, esse teste se torna um ponto crítico para a estimativa dos valores genéticos dos animais (BARON et al., 2002).

A atribuição de paternidade pela utilização de teste com o DNA está se tornando menos cara e o marcador do tipo microssatélite (STR), que tradicionalmente e internacionalmente tem sido a opção para o teste, tem dado cada vez mais lugar para metodologias que utilizam marcadores do tipo SNP, os quais fornecem um alto poder de exclusão do teste (FERNÁNDEZ et al., 2013; SHÜTZ; BRENIG, 2015; VAN EENENNAAM et al., 2007).

A estimativa de exclusão de paternidade pode ser definida como a probabilidade de excluir um indivíduo aleatoriamente como suposto pai frente a outro indivíduo amostrado

aleatoriamente na população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este tipo de análise pode ser definido em casos onde um dos pais é conhecido, ou nos casos onde nenhum dos pais está confirmado (JAMIESON; TAYLOR, 1997; VAN EENENNAAM et al., 2007).

Os marcadores do tipo STR possuem um alto nível de heterozigose e relativamente mais poder em determinar parentesco por locus. Contudo, a sua alta taxa de mutação entre as gerações e a presença de “*null alleles*” interferem na acurácia de reconstrução do pedigree (YU et al., 2015).

Novas plataformas utilizando SNPs têm sido propostas e oferecem vantagens operacionais sobre os convencionais STRs, fazendo deles uma alternativa promissora para o teste de paternidade.

Em rebanhos leiteiros, o teste é praticado por diversas razões, tanto para aumentar os ganhos genéticos (através do aumento da acurácia da avaliação animal e redução da consanguinidade) e para a manutenção acurada do pedigree (FISHER et al., 2009).

Os valores genéticos são aplicados em programas de seleção e são baseados na pressuposição que as informações de pedigree são acuradas e completas. Genealogias acuradas são importantes para uma decisão de seleção efetiva que irá assegurar um progresso genético (GARRITSEN et al., 2015).

A probabilidade da determinação de erros de paternidade é uma função do polimorfismo do loci genotipado (RON et al., 1996). E as proporções de erros de identificação de paternidade variam entre 2.9% a 36% mundialmente (RON et al., 1996; BARON et al., 2002)

Poucas ferramentas genéticas existem para a seleção de touros com desempenho superior (VAN EENENNAAM; WEBER; DRAKE, 2014). E quando esses reprodutores são utilizados em sistemas de RM, fica ainda mais difícil conhecer a produção deixada por cada um.

A importância do pedigree para o progresso genético tem sido demonstrada através de vários estudos e em diversas espécies de produção, contudo, a informação de genealogia ainda parece ser uma limitação recorrente em vários programas de melhoramento genético (GARRITSEN et al., 2015).

4.6 Marcadores SNP

Os marcadores moleculares são definidos como toda e qualquer informação molecular, oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que segue os padrões mendelianos de herança (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os primeiros estudos de identificação, caracterização e utilização de marcadores moleculares para caracterização de recursos genéticos e geração de ferramentas para o melhoramento animal datam do final da década de 80. E nos últimos 20 anos as tecnologias para geração de dados moleculares passaram por vários ciclos de renovação. A última onda de inovação tecnológica representa uma verdadeira revolução e trouxe metodologias para identificar e genotipar marcadores SNP de maneira massal (CAETANO, 2009).

Os marcadores SNP tem como base as alterações elementares da molécula de DNA, ou mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas: adenina, citosina, timina e guanina.

Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, ou principalmente em espaços intergênicos (sem função determinada). Em comparação ao STR, o SNP tem uma baixa informação de conteúdo polimórfico devido à sua natureza bi-alélica, mas é crescente o interesse da agricultura, pecuária e comunidade científica pela utilização do SNP em verificação de paternidade, pois são abundantes, ocorrem significativamente na população (>1%), são encontrados por todo o genoma, são robustos para manipulação laboratorial, tem uma herança relativamente estável e uma baixa taxa de mutação por geração, tem baixa taxa de erro de genotipagem, tem alto poder de automação para uso em largas escalas, podem ser usados para investigar regiões codificadoras e não codificadoras, possuem uma genotipagem de baixo custo por marcador, são muito úteis para a reconstrução de genealogias e mais de 50 mil SNP chips estão sendo usados mundialmente na genotipagem de milhares de animais influentes em diferentes raças (CAETANO, 2009; GUDEX et al., 2013; HAYES, 2011; HEATON, 2008; LENDE, 2008; MCCLURE et al., 2012; WOODWARD; ROSA; PAIVA, 2009; YU et al., 2015).

Por essas e outras vantagens os marcadores do tipo SNP vêm sendo utilizados em diversos trabalhos científicos e cada vez mais nos sistemas de produção agrícola e pecuária com o objetivo de melhorar as espécies para características de interesse econômico através de seleção genética ou como outro exemplo, através da identificação de indivíduos mais resistentes a doenças ou parasitas.

Diversos painéis com diferentes densidades de marcadores existem atualmente à disposição da comunidade científica e também de forma comercial para aplicação direta. Para isso, diferentes indústrias do setor estão investindo em plataformas tecnológicas, como é o caso da Sequenom, Inc.

A plataforma Sequenom MassARRAY tem várias características atraentes para usuários que desejam uma acurada genotipagem customizada para marcadores do tipo SNP com *multiplexing* e custo adicionais mínimos devido ao tipo dos *primers* de oligonucleotídeos

(GABRIEL; ZIAUGRA; TABBAA, 2009). Ela é um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) utilizado na análise de fragmentos de DNA. Nesse sistema, o tempo que as amostras levam para percorrer o caminho até o detector é uma função da massa do fragmento e com isso é possível obter esta massa com alta precisão (CBMEG, 2015).

Dessa forma, por sua facilidade na personalização de pequenos painéis de marcadores do tipo SNP, o painel de paternidade utilizado nesse estudo utiliza essa ferramenta para a genotipagem das amostras destinadas ao teste.

4.7 Avaliação Genética

O objetivo do melhoramento genético animal é alterar geneticamente populações de animais, ou seja, aumentar a frequência de genes (ou alelos) e de genótipos desejáveis, com o consequente reflexo favorável no mérito fenotípico médio de características destas populações que sejam importantes economicamente (PEREIRA, 2008).

O valor genético aditivo (do inglês *breeding value*), que é igual a duas vezes o valor da capacidade de transmissão, comumente conhecido como DEP (diferença esperada na progênie) quando falamos em rebanhos de corte ou PTA (*predicted transmitting ability*, traduzido como habilidade prevista de transmissão) no caso de rebanhos de leite, permite ao criador ter em mãos uma ferramenta para organizar e ordenar os animais de acordo com a sua necessidade e objetivo de seleção ou então, de acordo com a necessidade do mercado (ZADRA, 2012).

Contudo, esse valor genético é diretamente influenciado pela quantidade de informação utilizada, ou seja, pela quantidade de dados fenotípicos existentes para cada característica, ressaltando que a qualidade e uma boa coleta de dados também não podem ser esquecidas. Dessa forma, o volume de dados reflete na segurança obtida da estimativa do valor genético, onde quanto maior esse volume de informação fenotípica, maior será a confiabilidade do valor calculado.

Atribui-se a esta confiabilidade o nome de acurácia, que é uma medida da correlação entre o valor estimado e os valores das fontes de informação, ou seja, mede o quanto a estimativa que obtivemos é relacionada com o "valor real" do parâmetro. Ela varia de 0 a 1, onde quanto mais próximo de 1, maior será a confiabilidade da informação. Existem diferentes maneiras de calcular a acurácia, como exemplo a acurácia real, que não possui um comportamento linear com o número de progênies e por isso pode dificultar o entendimento por alguns criadores e a acurácia BIF (*Beef Improvement Federation*), utilizada na avaliação

genética de gado de corte nos EUA como solução para esse problema. Esta última é considerada mais conservadora na medida que em que um grande número de progênies é necessário para atingir valores altos e é uma medida que varia linearmente com a magnitude das possíveis mudanças do valor das DEPs (FERRAZ; ELER, 1999).

Para cada animal e para cada característica um valor genético e uma acurácia são calculados e para as estimativas dos valores genéticos vários modelos são propostos na literatura.

Dentro do algoritmo dos Modelos Mistos (MME: *Mixed Model Equation*) é possível modelar simultaneamente efeitos fixos (como exemplo, grupos de contemporâneos) e efeitos aleatório (por exemplo, os animais). Dessa maneira, podem-se obter soluções para esses dois tipos de efeitos. Diversos modelos podem ser especificados para as MME, dependendo da aplicação das características avaliadas e estrutura de dados desenvolvidos, como o Modelo Animal, Modelo Animal Reduzido e Modelo Touro entre outros. A equação básica que descreve estes modelos é:

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

em que:

y é um vetor de observações;

X é uma matriz de incidência dos efeitos fixos;

β é um vetor de efeitos fixos desconhecidos;

Z é uma matriz de incidência dos efeitos aleatórios;

a é um vetor de efeitos aleatórios genéticos desconhecidos para todos os indivíduos envolvidos na análise;

E é um vetor de efeitos aleatórios residuais desconhecidos.

No modelo Animal todos os indivíduos apresentam uma equação e a matriz Z é uma matriz de incidência, associando cada observação ao indivíduo que a produziu, e estima o valor genético do indivíduo, que corresponde ao dobro da DEP (PEREIRA, 2008).

O Modelo Animal mudou a forma de pensar na interpretação da covariância entre parentes para a estrutura de modelo linear, onde se determinam variâncias diretamente pelo ajustamento correspondente aos efeitos aleatórios do modelo de análise. As covariâncias entre os efeitos aleatórios para parentes são levadas em conta através da especificação da matriz de variâncias dos efeitos aleatórios. A variância genética aditiva é estimada como a variância do

mérito genético aditivo dos animais. Da mesma forma, os componentes genéticos não-aditivos podem ser estimados pelo ajustamento de um efeito aleatório correspondente, como a dominância ou efeito genético materno, para cada animal (VAYEGO, 2007)

A maioria dos métodos de seleção utilizados necessita de parentesco, ou relacionamento, entre os indivíduos de uma população obtendo uma melhor acurácia de predição (HENDERSON, 1975). Para a estimação destes parentescos foram desenvolvidos métodos que definiram conceitos e meios para calcular genes idênticos por descendência (IBD), que são usados para indicar a probabilidade de que dois alelos homólogos tenham sido herdados a partir de um ancestral comum (POWELL et al., 2010). Tradicionalmente, a probabilidade de que dois alelos sejam IBD pode ser estimada utilizando informações de pedigree da população. Assim, os programas de melhoramento genético utilizam-se esta informação de pedigree para calcular a probabilidade de que dois indivíduos compartilhem o mesmo alelo proveniente de um ancestral em comum, montando a matriz de parentesco conhecida como “Numerator Relationship Matrix” (NRM). A partir da definição desta matriz NRM, tornou-se possível a obtenção de componentes de variância para uma população-base e a predição de valores genéticos de indivíduos de qualquer geração, por meio do método da máxima verossimilhança restrita (REML) proposto por Patterson e Thompson (1971).

Análises uni características, ou seja, quando uma única característica é considerada na análise, podem ser obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita por meio do conjunto de programas MTDFREML (*Multiple Trait Derivative-Free Restricted Maximum Likelihood*), que é um conjunto de programas para estimar componentes de (co)variância usando modelo animal e soluções para efeitos fixos, valores genéticos, entre outras, podem ser obtidas através das análises. Por usar toda a matriz de parentesco é possível estimar o valor genético de um animal sem nenhum registro de produção, associando-o com os valores genéticos de seus parentes, presentes na matriz (HENDERSON, 1977).

5 REFERÊNCIAS

- ABIEC, 2014. **Rebanho bovino brasileiro**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>>. Acesso em: 04 maio 2014.
- ABIEC, 2015. **Rebanho bovino brasileiro**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 12 jul. 2015.
- ACNB, 2015. **A origem**. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca>>. Acesso em: 04 maio 2014.
- ADAMOV, N. et al. Microsatellite markers for pedigree verification in cattle. **Macedonian Journal of Animal Science**, v. 1, p. 9-15, 2011.
- ASBIA, 2012. Relatório Estatístico de Produção, Importação e Comercialização de Sêmen. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2012.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2013.
- ASBIA, 2014. Relatório Estatístico de Produção, Importação e Comercialização de Sêmen. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.
- BARON, E. E. et al. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, e. 4, p. 389-394, 2002.
- BEEFPOINT, 2015. **Nelore – Projeto Raças**. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/racas-e-genetica/nelore-conheca-mais-sobre-a-raca-que-representa-80-do-gado-de-corte-brasileiro-projeto-racas/>>. Acesso em: 12 jul. 2015.
- BLOG DO NELORE, 2012. Expectativas para a venda de sêmen em 2012. **Nelore do Brasil**. Disponível em: <http://blogdonelore.blogspot.com.br/2012_01_01_archive.html>. Acesso em 12 jul. 2015.
- BOICHARD, D.; BARBOTTE, L.; GENESTOUT, L. AccurAssign, software for accurate maximum-likelihood parentage assignment. **10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**, Vancouver, 2014.
- BOLIGON, A. A.; CARVALHEIRO, R.; ALBUQUERQUE, L. G. Evaluation of mature cow weight: Genetic correlations with traits used in selection indices, correlated responses, and genetic trends in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91 n. 1, 20-28, 2013.
- 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.

CARDOSO, V. et al. Formando lotes uniformes de reprodutores múltiplos e usando-os em acasalamentos dirigidos em populações Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 834-842, 2003.

CBMEG, 2015 – **Sequenom**. Disponível em: <<http://www.cbmeg.unicamp.br/node/397>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

CEPEA, 2014. **Perspectivas para o agronegócio em 2015**. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_Perspectivas%20Agroneg2015_relatorio.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2015.

ELER, J. P. et al. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 9, p. 2519-2527, 2004.

FERNÁNDEZ, M. E. et al. 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, n. 2, p. 185-191, 2013.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. Seleção de zebuínos para características produtivas. **SIMCORTE**, 1999. Disponível em: <<http://www.simcorte.com/site/anais.html>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa/CENARGEM**, d. 20, e. Brasília, p. 69-118, 1998.

FISHER, P. J. et al. The number of single nucleotide polymorphisms and on-farm data required for whole-herd parentage testing in dairy cattle herds. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 369-374, 2009.

GABRIEL, S.; ZIAUGRA, L.; TABBAA, D. SNP Genotyping Using the Sequenom UNIT 2.12 MassARRAY iPLEX Platform. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 2.12, p. 1-18, 2009.

GARRITSEN, C. et al. The impact of DNA parentage verification on breeding value estimation and sire ranking in South African Angora goats. **Small Ruminant Research**, v. 124, p. 30-37, 2015.

BRITO, F. V. et al. Conectabilidade nas avaliações genéticas. BEEFPOINT, 2006. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/melhoramento-genetico/conectabilidade-nas-avaliacoes-geneticas-32721/>>. Acesso em: 14 jun. 2014.

GUDEX, B. et al. Validation of a single-nucleotide polymorphism panel for parentage testing of farmed red deer. **Animal Genetics**, v. 45, p. 142-143, 2013.

HAYES, B. J. Technical note: Efficient parentage assignment and pedigree reconstruction with dense single nucleotide polymorphism data. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2114-2117, 2011.

HEATON, M. Parentage-based DNA traceback in beef and dairy cattle. **USDA-ARS/UNL Faculty**. 2008. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/705/>>. Acesso em: 01 abr. 2015.

HENDERSON, C. R. Best Linear Unbiased Prediction of Breeding Values Not in the Model for Records. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 5, p. 783-787, 1977.

HENDERSON, C. R. Use of relationships among sires to increase accuracy of sire evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1731-1738, 1975.

HEYEN, D. W. et al. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. **Animal Genetics**, v. 28, n. 1, p. 21-27, 2009.

JAKHESARA, S. J. et al. Parentage verification in field progeny testing program of Mehsana buffalo. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 4723-4728, 2012.

JAMIESON, A.; TAYLOR, St.C.S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v. 28, p. 397-400, 1997.

KIOS, D.; MARLE-KÖSTER, E. van; VISSER, C. Application of DNA markers in parentage verification of Boran cattle in Kenya. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, p. 471-476, 2012.

KOURY FILHO, W. **Escore visuais e suas relações com características de crescimento em bovinos de corte**. 2005. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2005.

KOURY FILHO et al. Estimativas de parâmetros genéticos para os escores visuais e suas associações com peso corporal em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p.1015-1022, 2010.

LUCHIARI FILHO, A.; MOURÃO, G. B. Melhoramento, raças e seus cruzamentos na pecuária de corte brasileira. In: LUCHIARI FILHO, A.; MOURÃO, G. B. **Nelore**. p. 40, ed. LinBife, Pirassunga, 2006.

MCCLURE, M. et al. Imputation of microsatellite alleles from dense SNP genotypes for parental verification. **Frontiers in genetics**, v. 3. a. 140, 2012.

MILLEN, D. D. et al. Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. **Animal Frontiers**, v. 1, n. 2, p. 46-52, 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, G. **Estudo de diferentes estruturas de grupos genéticos aditivos visando ao aumento da eficiência de seleção em bovinos de corte**. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

PATTERSON, H. D., THOMPSON R. Recovery of inter-block information when block sizes are equal. **Biometrika**, v. 58, p. 545-554, 1971.

PEREIRA, J. C. C. Melhoramento genético aplicado à produção animal. In: PEREIRA, J. C. C.; BERGMANN, J. A. G. **Avaliação Genética**. p. 205, ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2008.

PEREZ-ENCISO, M.; FERNANDO, R. L. Genetic evaluation with uncertain parentage: a comparison of methods. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, n. 1, p. 173-179, 1992.

PHOCAS, F.; LALOË, D. Should genetic groups be fitted in BLUP evaluation? Practical answer for the French AI beef sire evaluation. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, n. 3, p. 1-21, 2004.

POLLAK, E. J. Application and impact of new genetic technologies on beef cattle breeding: a real word perspective. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, p. 739-748, 2005.

POWELL, E. J.; VISSCHER, P. M.; GODDARD, M. E., Reconciling the analysis of IBD and IBS in complex trait studies. **Nature**, v. 11, p. 800-805, 2010.

RON, M. et al. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implication for Genetic Improvement. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 676-681, 1996.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R., Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de interesse zootécnico. **Documento Embrapa Cerrados**, e. ISSN 1517-5111, 2009.

SABIR, J. et al. Applying molecular tools for improving livestock performance: From DNA markers to next generation sequencing technologies. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 12, p. 541-553, 2014.

SHÜTZ, E.; BRENIG, B. Analytical and statistical consideration on the use of the ISAG-ICAR-SNP bovine panel for parentage control, using the Illumina BeadChip technology: example on the German Holstein population. **Genetics Selection Evolution**, v. 47:3, 2015.

VAN EENENNAAM, A. L. et al. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3159-3169, 2007.

VAN EENENNAAM, A. L.; WEBER, K. L.; DRAKE, D. J. Evaluation of bull prolificacy on commercial beef cattle ranches using DNA paternity analysis. **Journal of Animal Science**, v.92, p.2693-2701, 2014.

VAN VLECK, L. D. Misidentification in Estimating the Paternal Sib Correlation. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 10, p. 1469-1474, 1970.

VANKAN, D. M.; FADDY, M. J. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings. **Animal genetics**, v. 30, n. 5, p. 355-361, 1999.

VAYEGO, S.A. **Uso de modelos mistos na avaliação genética de linhagens de matrizes de frango de corte**. 2007. 121 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Londrina, 2007.

WOODWARD, B. W.; LENDE, T. van der. Single nucleotide polymorphisms for parentage testing, individual identification, and traceability. **Identification, Breeding, Production, Health and Recording of Farm Animals - 36th ICAR Biennial Session**, p. 16-20, 2008. Disponível em: <http://www.icar.org/Documents/technical_series/tec_series_13_Niagara.pdf>. Acesso em: 05 de maio 2013.

YU, G.C. et al. Effectiveness of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for parentage analysis in European domestic pigs. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p.1362-1370, 2015.

ZADRA, L. El F. Seleção de bovinos e interpretação de DEP (diferença esperada na progênie). **APTA 2012**. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2012/janeiro-junho-2/1084-selecao-de-bovinos-e-interpretacao-de-dep-diferenca-esperada-na-progenie/file.html>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

CAPITULO I

6 IMPACTOS DO RECONHECIMENTO DE PATERNIDADE NA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE ANIMAIS DA RAÇA NELORE DE UMA FAZENDA COMERCIAL

RESUMO

A atribuição correta de paternidade é importante para a manutenção de informações de pedigree e, conseqüentemente, para a estimativa dos valores genéticos dos animais submetidos a programas de seleção. A utilização de marcadores do tipo SNP vem aumentando com a seleção genômica e em diferentes painéis de teste de parentesco para várias espécies. A identificação de parentesco pode ser obtida para animais de diferentes idades, mas este estudo indicou que o maior ganho na acurácia das DEPs foi demonstrado em animais mais jovens, com pouca ou sem informação fenotípica de progênie. De maneira geral, como a correção de paternidade aumentou a geração de laços genéticos entre os animais, todos os animais presentes na avaliação foram beneficiados e também os reprodutores e matrizes apresentaram ganhos de acurácia nas estimativas dos seus valores genéticos. Conflitos de seleção genética também foram analisados para uma safra de animais com avaliação fenotípica completa (safra 2011) e mostraram que existem divergências na classificação dos animais entre as duas avaliações realizadas. Foram observados maiores conflitos para a característica de peso a desmama, mas de maneira geral, os conflitos variaram de 14 a 52% se considerada a somatória das diferenças de seleção por característica e sexo do animal. Os resultados deste trabalho sugerem também que o teste de parentesco por DNA é uma ferramenta que pode aumentar a precisão do pedigree e, inclusive, o desempenho da avaliação genética em um programa de melhoramento genético bovino.

Palavras-chave: bovinos de corte; Nelore; Polimorfismo de nucleotídeo único; paternidade; acurácia

ABSTRACT

The correct assignment of paternity is important to the maintenance of pedigree information and consequently for the estimation of breeding values in selection programs. The use of SNP type markers has increased use for genomic selection and in different panels of parentage testing of many species. Parentage identification can be obtained for animals of different ages but this study indicated that the greatest improvement of EPD accuracy was shown in younger animals, since they have few, if any, progeny phenotype information. In general, the use of tests such as paternity correction increased the generation of genetic ties between the animals. All animals present in the genetic evaluation benefitted. Additionally, dams and sires showed gains in their accuracy of breeding value estimation. Selection conflicts were also analyzed for animals with complete phenotypic data (2011 crop) and showed that there are differences in the animals rank between both assessments. Higher conflicts were observed for weaning weight, but for the other traits, those conflicts fluctuated between 14% and 52% when considering the sum of both difference per trait and animal gender. The results for this study also suggest that a DNA paternity test is a tool that can increase the accuracy of pedigree and increase the performance of genetic evaluation in a beef breeding program.

Key words: beef cattle; Nellore; Single nucleotide polymorphism; parentage; accuracy

6.1 INTRODUÇÃO

A produção animal está passando por uma mudança na intensificação da produção nos últimos anos. Torna-se cada vez mais dinâmica e o valor da informação é indispensável para a gestão eficiente dos sistemas em que os fatores genéticos relacionados com a produção e a reprodução interferem diretamente com os resultados. Empresas rurais têm assumido um perfil altamente profissional, buscando retornos econômicos para garantirem seu sucesso em mercados cada vez mais competitivos, para garantirem a sustentabilidade financeira da operação. Assim, a melhoria genética dos animais por características econômicas constitui um fator essencial para a pecuária moderna.

O Brasil é um dos exportadores de carne bovina mais importantes do mundo e tem o maior rebanho comercial do mundo. No entanto, o ciclo de produção necessita ser mais eficiente para fornecer demandas internas e externas no futuro. O país tem uma indústria de gado de corte madura baseada em bovinos alimentados principalmente por pastagem, onde a criação do gado *Bos indicus*, especialmente da raça Nelore, é uma prática comum (MILLEN et al., 2011).

A avaliação genética por meio de programas de melhoramento genético tem sido uma ferramenta eficiente para aumentar a produção e para ajudar o criador a selecionar os melhores animais. No entanto, a qualidade da informação fenotípica e a relação de parentesco entre os indivíduos podem influenciar diretamente os resultados. E considerando o fato de que grandes grupos de animais são trabalhados em uma mesma área, a informação de paternidade pode não ser definida após o fim da estação reprodutiva.

A coleta de dados genealógicos pode ser inconclusiva e prejudicial para práticas de manejo (FISHER et al., 2009). E tendo uma forma eficiente de identificar a paternidade de animais, considerada inicialmente como desconhecida, *a posteriori* permite que os sistemas de acasalamentos sejam mais flexíveis (BOICHARD; BARBOTTE; GENESTOUT, 2014).

Uma estratégia para contornar a falta da informação de parentesco é formação de grupos de genéticos, que permite a inclusão de dos animais com paternidade desconhecida nas avaliações genéticas e que tem como consequência uma melhor predição dos valores genéticos preditos, proporcionando uma melhor seleção dos animais e favorecendo o progresso genético da população (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2013).

Por outro lado, os marcadores de DNA estão se tornando cada vez mais importantes no melhoramento de animais e têm sido utilizados com sucesso na identificação de bovinos em testes de paternidade e para estabelecer relações entre dois ou mais indivíduos (HEYEN et al., 1997; HEATON et al., 2002; CLARKE et al., 2014). Os microssatélites ou *short tandem repeats* (STRs) foram os marcadores genéticos escolhidos e trabalhados por mais de décadas na identificação e confirmação de paternidade animal (FERNÁNDEZ et al., 2013), no entanto, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) estão entre as contribuições mais recentes em relação à variação da sequência de DNA (SABIR et al., 2014) e existe um interesse crescente na utilização deles para esta finalidade. Sua abundância, as baixas taxas de erro de genotipagem e a padronização entre os laboratórios permitem uma automação de alto rendimento de centenas de milhares de loci com alta precisão de medição, a um custo que permite os estudos em grande escala (VAN EENENNAAM et al., 2007; MATUKUMALLI et al., 2009).

A identificação de parentesco usando marcadores de DNA abre novas oportunidades para a pecuária de corte (GOMEZ-RAYA et al., 2008). Dessa forma, o objetivo deste estudo

foi verificar o impacto na acurácia dos valores genéticos das características produtivas utilizadas no índice de seleção de animais em um programa real de melhoramento genético comercial, após o teste de identificação de paternidade usando marcadores SNP. Além de medir as porcentagens de conflitos de seleção, ou seja, a diferença entre os animais selecionados em cada uma as avaliações genéticas geradas, em uma das safras analisadas.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Animais e banco de dados

O estudo foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo, localizada em Pirassununga/SP, com o Grupo de Melhoramento de Animais e Biotecnologia (GMAB), onde os dados estavam armazenados. O banco de dados pertence à Agropecuária CFM, uma empresa independente de pecuária que administra seu próprio programa de melhoramento.

Nesse estudo, dois conjuntos de animais foram definidos com o objetivo de realizar comparações entre seus de dados. O primeiro conjunto de animais analisado não possuía nenhum animal com reconhecimento de paternidade por teste de DNA e para compor esse grupo, todos os 490.118 animais presentes no banco de dados do programa e com informação fenotípica foram considerados nas análises. Esse banco era composto por 70% de animais sem informação de paternidade, incluindo os fundadores, e 30% de animais com informação de paternidade. Contudo, nas safras mais novas essa diferença na proporção de animais sem informação de paternidade foi diminuindo. O segundo conjunto de animais analisado considerava bezerros cuja paternidade foi atribuída por teste de DNA e para compor esse grupo, 7.995 bezerros (dos 490.118 animais) nascidos em sete safras distintas tiveram sua paternidade informada e alterada no banco de dados.

Cada conjunto de animais foi classificado em um dos nove grupos seguintes: reprodutores e matrizes participantes somente dos arquivos de pedigree (Touro_Ped e Vaca_Ped), reprodutores e matrizes com progênes avaliadas para características produtivas, ou seja, com dados fenotípicos coletados (Touro_Fen e Vaca_Fen), reprodutores cujas progênes foram atribuídas pelo teste de DNA (Touro_DNA), machos e fêmeas que nasceram em uma das sete safras de 2007 a 2013 (Machos e Fêmeas), machos e fêmeas que nasceram em uma das sete safras de 2007 a 2013 e que tiveram paternidade atribuída por teste de DNA (Macho_DNA e Fêmea_DNA).

Amostras de pelo foram coletadas de todos os animais que a Agropecuária CFM selecionou como os melhores no momento das avaliações genéticas prévias e que não possuíam paternidade reconhecida e de todos os touros que haviam participados da estação reprodutiva que originaram as safras em questão. Elas foram armazenadas em cartões apropriados até a extração do DNA e o processo de genotipagem. O DNA foi coletado de cada bezerro e de cada touro que participou das análises de parentesco.

6.2.2 Genotipagem e Teste de Parentesco

A genotipagem do DNA foi feita utilizando um painel de paternidade comercial, *Bovine SeekSire indicus*, obtida como parte do serviço de genotipagem do laboratório GeneSeek (empresa americana do grupo Neogen localizado em Lincoln, NE). Genótipos com qualidade de leitura inferior a 80% foram eliminados das análises. O painel era composto por marcadores da Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG - *International Society for animal genetics*) e outros selecionados pelo próprio laboratório, conforme necessário em seus estudos para animais das raças *indicus*, totalizando um mínimo de 200 marcadores. Toda a genotipagem foi realizada por meio de serviços da GeneSeek e as análises de paternidade foram conduzidas no escritório brasileiro da Neogen.

Os genótipos dos bezerros foram comparados com os genótipos dos touros utilizando o programa SireMatch (POLLAK, 2006), de John Emil Pollak, diretor da US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE.

Todas as análises de paternidade foram realizadas dentro dos grupos de manejo, ou seja, os produtos de um determinado grupo tiveram suas informações contrastadas somente com os touros participantes do mesmo grupo, aumentando a eficiência do teste e também somente os animais com um mínimo de 80% dos marcadores passíveis de comparação foram considerados.

Para um touro ser qualificado como pai de uma progênie não foi aceito que ele tivesse mais que duas exclusões, ou seja, até duas incompatibilidades alélicas entre o produto e o touro, para probabilidades de reconhecimento de 90 a 100% ou que tivesse mais de uma exclusão para probabilidades de 85 a 89% e para todos os demais valores de probabilidades, o touro era desclassificado.

6.2.3 Avaliação genética

O índice de seleção empírico utilizado pelo programa de melhoramento da CFM é a ponderação de quatro características produtivas e tem sido usado desde 1998 para classificar e ordenar os animais para um melhor gerenciamento e seleção genética (CFM, 2014). Uma vez que essas características são a diretriz do programa, elas foram selecionadas para este estudo e, em seguida, os valores genéticos e suas acurácias foram calculados. As características utilizadas foram: peso ao desmame (PESDES), ganho de peso pós-desmame em 345 dias (GSOB), circunferência escrotal (CE) aos 18 meses de idade, e classificação visual de musculatura aos 18 meses de idade (MUSC).

As estimativas dos valores de melhoramento e as acurácias reais foram realizadas com a equação de modelo misto, utilizando o modelo animal unicaracterística. O programa MTDFREML (*Multiple Trait Derivative-Free Restricted Maximum Likelihood*) foi utilizado para avaliar todos os animais no arquivo de pedigree (BOLDMAN et al., 1995), considerando a equação:

$$Y = X\beta + Zu + Sm + Wpe + e$$

Onde:

Y = Vetor de observações (PESDES, GSOB, CE, MUSC);

β = Vetor de efeitos fixos;

u = Vetor de efeitos aleatórios;

m = Vetor de efeitos aleatórios maternos;

pe = Vetor de efeitos aleatórios de ambiente permanente;

e = Vetor de efeitos aleatórios residuais;

X, Z, S e W = são matrizes de incidência conhecidas relacionadas aos registros (Y) para os efeitos fixos (β), os efeitos aleatórios dos animais (u), os efeitos aleatórios maternos (m) e os efeitos aleatórios residuais (e).

A acurácia real utilizada nas comparações utiliza a seguinte equação:

$$r = \sqrt{1 - \frac{PEV}{\sigma_g^2}}$$

Onde:

r = Correlação entre o valor genético estimado e o valor real;

PEV = Variância do erro de predição;

σ_g^2 = Variância genética aditiva para cada característica;

O impacto da identificação de paternidade sobre as precisões dos valores genéticos das características foi comparado entre os dois bancos de dados: antes e depois da atribuição de paternidade. Os resultados foram comparados pela correlação de Pearson (ρ) que avaliou o grau de associação entre os valores das duas avaliações genéticas:

$$\rho_{y,\hat{y}} = \frac{1}{n_{data}} \sum_{i=1}^{n_{data}} \frac{cov(y, \hat{y})}{\sigma_y \sigma_{\hat{y}}}$$

Onde, $cov(y, \hat{y})$ é a covariância entre a avaliação genética que não possui animais com paternidade reconhecida por teste de DNA e a avaliação genética após o teste de parentesco; $\sigma_y \sigma_{\hat{y}}$ são os desvios padrões para esses valores; n_{data} é o número de observações nas bases de dados.

6.2.4 Conflitos de seleção

Os conflitos de seleção foram analisados através da ordenação dos animais em cada uma das características avaliadas, mas considerando somente a última safra com avaliação fenotípica completa, ou seja, aquela última safra cujos animais já havia passado pelas coletas de dados na idade de desmama e sobreano, a título de ilustração do que pode acontecer na prática. A safra considerada foi a 2011 e um ponto de corte de seleção de 20% foi atribuído para simular a média de porcentagem de seleção dos programas de melhoramento genéticos com projetos técnicos aprovados pelo MAPA. Além disso, foram gerados os conflitos para outros dois possíveis cenários de seleção, onde foram consideradas as seleções dos 10% e dos 30% melhores animais para as características analisadas.

Os conflitos de seleção foram avaliados pelo cálculo da proporção de animais com classificação divergente ao serem selecionados pelos valores genéticos das características na população. Gráficos de dispersão entre as estimativas dos valores genéticos foram construídos por meio de funções de gráficos do pacote estatístico R e foram traçadas as linhas de corte de seleção para o cenário dos 20% melhores animais.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As observações e estatísticas descritivas de todas as características analisadas e para os dois bancos de dados considerados são apresentadas na Tabela 1. As informações fenotípicas

foram as mesmas em ambos, pois a única coisa que divergiu foram as informações de paternidade, que alteraram somente os arquivos de pedigree.

Tabela 1 - Estatísticas descritivas para as características analisadas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculosidade, pontos)

Característica	N	Média	DP	CV	Min	Max
PESDES	488.740	173,64	28,73	16,54	62,00	317,00
GSOB	176.122	111,76	35,21	31,50	-60,00	334,34
CE	81.374	27,22	3,33	12,23	15,00	44,00
MUSC	176.291	3,40	1,05	30,78	1,00	6,00

N = número de animais; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; Min = valor mínimo; Max = valor máximo.

Um total de 7.995 bezerros tiveram atribuição de paternidade com base nos resultados do teste de DNA, sendo que destes, 6.293 eram machos e 1.702 eram fêmeas. Aos machos foram dadas maiores oportunidades uma vez que um dos objetivos comerciais da fazenda é a comercialização de touros. A distribuição desses bezerros dentro das sete safras de nascimento e classificados por sexo é apresentada na Tabela 2:

Tabela 2 - Distribuição de bezerros por safra de nascimento e sexo

Safra	Machos	Fêmeas	Total
2007	648		648
2008	825		825
2009	741		741
2010	1.181	33	1.214
2011	1.237	412	1.649
2012	916	676	1.592
2013	745	581	1.326
Total	6.293	1.702	7.995

O impacto na acurácia de cada característica analisada foi expresso em porcentagem, sendo essa uma relação entre os valores encontrados para as duas avaliações genéticas. Os valores calculados para os reprodutores e para as matrizes, considerando as quatro características avaliadas são apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Impacto de acurácia expressa em porcentagem de incremento para características produtivas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculabilidade, pontos) considerando os grupos reprodutores e matrizes.

Touro_DNA = apenas touros que foram indicados com pais por teste de DNA; Touro_Fen = touros com progênie avaliadas; Touro_Ped = touros sem progênie avaliada; Vaca_Fen = matrizes com progênie avaliadas; Vaca_Ped = matrizes sem progênie avaliadas;

O grupo de touros composto por apenas reprodutores que foram indicados com pais de animais através do teste de paternidade por DNA foram os que apresentaram um maior incremento nos valores de acurácia sendo esses iguais a 9,62% para a característica de peso a desmana, 8,46% para ganho de peso no pós-desmana, 5,40% para circunferência escrotal e 8,43% para escore de musculatura. O próximo grupo com maiores ganhos foram os dos touros com progênie avaliadas, mas de maneira geral todos os grupos, inclusive os de matrizes também foram beneficiados pelo reconhecimento de paternidade, de uma maneira direta ou indireta, confirmando os ganhos para a avaliação genética pela adição das informações de pedigree na matriz de parentesco.

Contudo, entre os nove grupos de animais criados para essa avaliação, os grupos de produtos, ou seja, animais jovens, e que receberam um pai pelo teste de paternidade foram os mais beneficiados, onde eles obtiveram um ganho de mais de 16% de ganho em acurácia de predição dos valores genéticos. Esses resultados são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Impacto de acurácia expressa em porcentagem de incremento para características produtivas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculabilidade, pontos) considerando os grupos de produtos machos e fêmeas.

Macho = todos os machos nascidos na safra 2007 ou posteriormente; Macho_DNA = todos os machos nascidos na safra 2007 ou posteriormente e com um touro atribuído por teste de DNA; Fêmea = todas as fêmeas nascidas na safra 2007 ou posteriormente; Fêmea_DNA = todas as fêmeas nascidas na safra 2007 ou posteriormente e com um touro atribuído por teste de DNA.

Observando a Figura 5, todos os animais da safra tiveram um incremento nos valores das acurácias, mostrando mais uma vez a importância da atribuição de paternidade para a avaliação genética dos animais, uma vez que esse reconhecimento do pai estabelece novos laços genéticos (novos laços de parentesco) não existentes anteriormente e assim, contribui para uma melhor amarração do conjunto total de informações de pedigree. Fries e Roso (1997) definiram a existência de um laço genético quando um existe um touro ou uma vaca com uma progênie dentro de um grupo de contemporâneos e ainda sugeriram a existência de pelo menos 10 laços para que exista uma conexão entre os grupos. E dessa forma, quando maior a atribuição das paternidades, melhor se dará as formações desses laços.

Muitas vezes, a informação incorreta sobre os reprodutores pode comprometer os resultados do programa de testes de progênie e, portanto, a correta identificação dos touros é imensamente importante (JAKHESARA et al., 2012). A perda de informações de pedigree é comum em grandes rebanhos onde, por vezes, as informações podem ser difíceis até de serem obtidas. (CASELLAS et al., 2007). Nesse estudo somente 7.995 animais receberam um pai pelo exame de DNA, mas esse benefício poderia ter se estendido para todos animais com paternidade desconhecida, o que poderia resultar em até maiores ganhos em precisão dos valores genéticos calculados.

Em geral, o uso dos testes de DNA para atribuição de reprodutores aumentou a precisão da estimativa dos valores de genéticos das características de PESDES; GSOB; CE e MUSC quando comparada aos conjuntos de animais onde o reprodutor não foi identificado. Isso também foi observado em um estudo realizado por Baron et al., 2002, em que o valor genético dos touros foi alterado após a segunda avaliação (sem erros de identificação), e com as informações já relatadas sobre a importância da qualidade de dados e da qualidade dos dados de pedigree na avaliação genética. O impacto foi maior em animais jovens que receberam um reprodutor atribuído através do teste de parentesco, ou seja, em possíveis tourinhos e novilhas de reposição, uma vez que praticamente só as informações de desempenho próprios contribuem para as estimativas dos valores genéticos. Olhando para um cenário real, o aumento da acurácia leva ao aumento do ganho genético por promover o encurtamento do intervalo de gerações, já que os animais mais jovens passam a ser utilizados como reprodutores e matrizes precocemente, e pelo aumento acurácia em si, que apresenta relação com ganho genético.

A correlação de Pearson apresentou um coeficiente de 0,98 em todas as características, indicando uma forte correlação entre as duas avaliações genéticas.

As dificuldades em avaliar a fertilidade em bovinos machos e fêmeas são bem documentadas e o melhoramento genético ainda é dificultado pela baixa herdabilidade das características de fertilidade (VAN EENENNAAM et al., 2014). Neste estudo, a circunferência escrotal obteve um ganho de até 7% (em média) no grupo de machos (Macho_DNA), nas quais um reprodutor foi atribuído e 5% para esses touros (Touro_DNA), o que era esperado, uma vez que a quantidade de informação fenotípica havia aumentado para eles através da identificação correta de seus bezerras. Isso implica que os testes de parentesco podem ser utilizados como uma ferramenta pelos criadores para a seleção precoce de características de fertilidade em animais e como um benefício alternativo para aumentar a produção em fazendas de exploração comercial. (YOKOO et al., 2012; SOUSA et al., 2015).

O teste de DNA pode ser usado para atribuir a paternidade com segurança, proporcionando uma oportunidade para investigar o desempenho do touro em pastagens de reprodução multi-reprodutores comerciais e deve ser rentável para as populações de gado leiteiro e de corte (RON et al., 1996; KIOS et al., 2012; VAN EENENNAAM et al., 2014). Neste estudo, o teste de DNA foi apresentado como uma importante ferramenta para aumentar a acurácia dos valores genéticos das características analisadas, especialmente nos grupos de animais mais jovens. Outros benefícios podem ser derivados do teste de paternidade como a melhora estimativa dos coeficientes de endogamia entre os animais e com isso melhorar o sistema de acasalamento, a quantidade ou a qualidade dos animais participantes de um teste de

progênie, a remoção de touros de prolificidade baixa ou o aumento da relação touro:vaca usando os touros mais prolíficos. Nesse último caso, a fazenda poder-se-ia reduzir os custos associados à manutenção e manutenção de um touro inativo ou não-produtivo (GOMEZ-RAYA et al., 2008; VAN EENENNAAM et al., 2014).

Além disso, com a técnica do reconhecimento de paternidade pode-se corrigir problemas de manejo, onde a perda de informações por diversos motivos como leitura e/ou anotação errada do dado, dificuldade de grafia ou leitura do mesmo e ainda a perda de anotações de campo, podem comprometer o controle zootécnico.

Os SNPs são bem adequados para processos de genotipagem de alto rendimento, e combinado com o fato de que eles são abundantes no genoma, podem ser facilmente utilizados para identificar se um animal é ou não produtivo. Anderson e Garza (2006) previram que eles se tornariam rapidamente o marcador selecionando para inferência de parentesco. Atualmente, a utilização de marcadores SNPs para testes de paternidade vem aumentando e já são utilizados em várias associações animais, principalmente as americanas.

Outro fator analisado foi a diferença de seleção entre os animais classificados como melhores nas duas avaliações genéticas, ou seja, os conflitos de seleção.

Nas Figuras de 6 a 12, são apresentados os conflitos encontrados na safra de 2011, para machos e fêmeas, cujas avaliações fenotípicas estavam completas (desmama e sobreano) como exemplificação do que aconteceria na prática durante a seleção dos animais classificados como melhores por estarem no topo do ranqueamento de uma característica considerada. Os conflitos de seleção são indicados pelas divergências nas classificações dos animais, ou seja, quando um animal é selecionado por um critério e descartado por outro e nesse caso, selecionados pelo banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN).

Nessas figuras, estão indicados os pontos de truncamento para a seleção dos 20% melhores animais em cada critério de seleção com base em todo rebanho analisado. E além disso, nas bases de cada eixo são apresentadas as curvas de distribuição desses valores genéticos.

Figura 6 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de circunferência escrotal (CE) com linha de truncamento dos 20% melhores machos

Analisando a Figura 6, temos que os valores das DEPs para a característica CE seguiram uma distribuição normal de valores para as duas avaliações genéticas realizadas e isso pode ser observado pelos pequenos gráficos internos nos eixos correspondentes. Os animais que seriam selecionados por ambas avaliações correspondem a 13% dos animais acima do ponto de corte de seleção e certificação e os outros 7% divergiram e só seriam selecionados caso o teste de paternidade não tivesse sido realizado. Dessa mesma forma, podemos analisar as demais figuras correspondentes.

Figura 7 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de ganho de peso pós-desmama (GP = GSOB) com linha de truncamento dos 20% melhores machos

Figura 8 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de escore de musculatura (MUSC) com linha de truncamento dos 20% melhores machos

Figura 9 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de peso a desmana (PEDES) com linha de truncamento dos 20% melhores machos

Figura 10 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de ganho de peso pós-desmama (GP = GSOB) com linha de truncamento das 20% melhores fêmeas

Figura 11 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de escore de musculatura (MUSC) com linha de truncamento das 20% melhores fêmeas

Figura 12 - Dispersões dos valores genéticos do banco de dados sem paternidade por DNA (PV) e valores genéticos com paternidade por DNA (PN) para a característica de peso a desmana (PESDES) com linha de truncamento das 20% melhores fêmeas

Os maiores conflitos foram observados para os machos na característica de peso a desmana, onde 20% dos animais que seriam selecionando pelo critério de certificação do MAPA, seriam selecionados em apenas uma das avaliações genéticas, ou seja, seriam animais

selecionados pela avaliação genética sem nenhuma informação de reconhecimento de paternidade e não seriam na avaliação genética que recebeu animais com informação de paternidade pelo teste de DNA. Esses 20% de animais a cima da linha de truncamento representam 4% de diferença nos animais selecionados e pode ser considerada com peso importante, pois se tratam de animais que seriam usados na reprodução da fazenda ou mesmo, que seriam comercializados para trabalharem em outras fazendas ou ainda em uma escala maior, possíveis animais de centrais de coleta de sêmen ou embriões.

Os conflitos de seleção variaram entre 7 e 21% no critério de seleção dos TOP 20% nas características avaliadas e considerando somente os machos e fêmeas da safra de 2011. Contudo, se considerarmos o total de conflitos de seleção, ou seja, se somarmos o que foi selecionado (mas que não seria) com o que deixou de ser selecionado por falta de uma maior qualidade de dados de dados, teríamos que dobrar esses valores de conflitos. E assim, verificaríamos a magnitude total que alterou o processo de seleção causado pela ausência do teste de paternidade, mesmo que este tenha sido realizado em apenas parte dos animais.

Outros valores foram gerados a partir de uma outra forma de verificação dos conflitos e que consideraram diferentes intervalos de seleção, ou seja, mudando o ponto de corte de seleção dos animais, que foram assim gerados: Seleção dos (as) TOP 10%, que significa a seleção dos 10% melhores animais do ranque, Seleção dos (as) TOP 20%, que significa a seleção dos 20% melhores animais e Seleção dos (as) TOP 30%, que significa a seleção dos 30% melhores animais. Assim fazendo, esses conflitos totais possuem uma variação de 13,78 a 51,72% para os machos e de 14,99 a 25,95% para as fêmeas, conforme apresentadas na Tabela 3.

Com base nesses pontos de seleção, nota-se que quanto menor foi a porcentagem dos animais selecionados, maior foram os conflitos encontrados para todas as características e isso mostra que existiu uma maior variação de ranqueamento dos animais mais extremos no sentido positivo da curva de seleção. E considerando que esses são os animais primeiramente selecionados pelas propriedades como animais de reposição e para reprodução, conclui-se que maiores seriam os erros de seleção por falta de uma melhor qualidade dos dados de pedigree, ou seja, por falta do reconhecimento de paternidade dos animais filhos de RMs.

Tabela 3 – Porcentagem de conflitos de seleção para produtos machos e fêmeas da safra 2011 nas quatro características produtivas de PESDES (Peso ao desmame, kg); GSOB (ganho de peso pós-desmame, kg); CE (circunferência escrotal, cm) e MUSC (classificação visual de musculosidade, pontos) e considerando 3 diferentes pontos de corte de seleção (10, 20 e 30%)

	CE	GSOB	MUSC	PESDES
Machos				
<i>Seleção dos TOP 10%</i>				
Selecionados pelo PN	10.16%	12.11%	17.14%	25.86%
Selecionados pelo PV	10.30%	12.11%	17.38%	25.86%
Conflito de seleção	20.46%	24.22%	34.52%	51.72%
<i>Seleção dos TOP 20%</i>				
Selecionados pelo PN	7.47%	11.74%	14.54%	20.12%
Selecionados pelo PV	7.40%	11.81%	14.29%	20.18%
Conflito de seleção	14.88%	23.55%	28.83%	40.30%
<i>Seleção dos TOP 30%</i>				
Selecionados pelo PN	6.82%	11.01%	12.91%	18.30%
Selecionados pelo PV	6.96%	11.01%	12.61%	18.30%
Conflito de seleção	13.78%	22.02%	25.52%	36.59%
Fêmeas				
<i>Seleção das TOP 10%</i>				
Selecionadas pelo PN		9.97%	7.75%	12.97%
Selecionadas pelo PV		9.97%	8.19%	12.97%
Conflito de seleção		19.94%	15.94%	25.95%
<i>Seleção das TOP 20%</i>				
Selecionadas pelo PN		8.48%	9.16%	12.75%
Selecionadas pelo PV		8.48%	8.95%	12.75%
Conflito de seleção		16.96%	18.11%	25.49%
<i>Seleção das TOP 30%</i>				
Selecionadas pelo PN		7.50%	8.59%	12.09%
Selecionadas pelo PV		7.50%	8.92%	12.09%
Conflito de seleção		14.99%	17.51%	24.18%

Selecionados pelo PN = animais selecionados pela avaliação genética do banco de dados com animais com paternidade por DNA; Selecionados pelo PV = animais selecionados pela avaliação genética do banco de dados com animais sem paternidade por DNA;

Dessa maneira, os animais selecionados pela avaliação realizada a partir do banco de dados que recebeu animais com pais atribuídos pelo teste de paternidade, são os indicados, pois possuem melhores acurácias nos valores de predição como um todo e também por mostrarem que foram melhor classificados nos diferentes pontos de corte de seleção. E embora muitos programas de melhoramento genético estejam começando a utilizar a seleção genômica, Munhoz et al. (2014) também recomendaram a utilização de painéis de marcadores para corrigir os erros de pedigree e então usar a informação de melhor qualidade para desenvolver os modelos de predição de seleção genômica.

6.4 CONCLUSÃO

Na criação de animais com finalidade produtiva, pedigrees precisos são essenciais para tomada de decisões eficazes em programas de melhoramento genético. Neste estudo, o reconhecimento da paternidade causou alteração na predição dos valores genéticos de toda a população, bem como, alterações em suas acurácias. Contudo, entre os animais jovens os benefícios foram maiores.

Os conflitos de seleção também mostraram a importância do reconhecimento de paternidade, onde animais que não seriam selecionados podem estar sendo por falta de uma maior qualidade dos dados de pedigree.

Em resumo, a identificação de paternidade por teste de DNA é uma nova oportunidade para programas de melhoramento aumentarem a precisão das informações de parentesco e, conseqüentemente, a as acurácias das estimativas de valores genéticos de produção e classificação dos animais para o processo de seleção dos futuros reprodutores e novilhas de reposição, proporcionando uma maior segurança nas tomadas de decisões.

6.5 REFERÊNCIAS

ANDERSON, E. C.; GARZA, J. C. The power of single nucleotide polymorphisms for largescale parentage inference. **Genetics**, v. 172, p. 2567-2582, 2006.

BARON, E. E. et al. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, e. 4, p. 389-394, 2002.

BOICHARD, D.; BARBOTTE, L.; GENESTOUT, L. AccurAssign, software for accurate maximum-likelihood parentage assignment. **10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**, Vancouver, 2014.

BOLDMAN, K.G. et al. **A manual for use of MTDFREML: A Set of Programs to Obtain Estimates of Variances and Covariances** – USDA-ARS., 1995.

CASELLAS, J.; PIEDRAFITA, J.; VARONA, L. Bayes factor for testing between different structures of random genetic groups: A case study using weaning weight in Bruna dels Pirineus beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 39, p. 39-53, 2007.

CFM, 2014. Sumário de Touros. **CFM**. Disponível em: <<http://agrocfm.com.br/informacoes-tecnicas/sumarios/>>. Acesso em: 14 out. 2014.

CLARKE, S. M. et al. A High Throughput Single Nucleotide Polymorphism Multiplex Assay for Parentage Assignment in New Zealand Sheep. **PLOS ONE**, v. 9, p. e93392, 2014. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093392>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

FERNÁNDEZ, M. E., et al. 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, n. 2, p. 185-191, 2013.

FISHER, P. J. et al. The number of single nucleotide polymorphisms and on-farm data required for whole-herd parentage testing in dairy cattle herds. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 369-374, 2009.

FRIES, L. A.; ROSO, V. M. Conectabilidade em avaliações genéticas de gado de corte: uma proposta heurística. In: 34 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1997, **Anais da XXXIV Reunião Anual da SBZ**, p. 159-161, Juiz de Fora, 1997.

OLIVEIRA JÚNIOR, G. A. de et al. Definição de grupos genéticos aditivos visando melhor predição de valores genéticos em bovinos de corte. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 14, n. 2, p. 277-286, 2013.

GOMEZ-RAYA, L. et al. The value of DNA paternity identification in beef cattle: Examples from Nevada's free-range ranches. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 17-24, 2008.

HEATON, M. P. et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 272-281, 2002.

HEYEN, D. W. et al. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. **Animal Genetics**, v. 28, n. 1, p. 21-27, 2009.

JAKHESARA, S. J. et al. Parentage verification in field progeny testing program of Mehsana buffalo. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 4723-4728, 2012.

KIOS, D.; MARLE-KÖSTER, E. van; VISSER, C. Application of DNA markers in parentage verification of Boran cattle in Kenya. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, p. 471-476, 2012.

MATUKUMALLI, L. K. et al. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. **PLOS ONE**, v. 4, p. e5350, 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005350>>. Acesso em 12 jun. 2014.

MILLEN, D. D. et al. Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. **Animal Frontiers**, v. 1, n. 2, p. 46-52, 2011.

MUNHOZ, P. R. et al. Genomic Relationship matrix for correcting pedigree errors in breeding populations: impact on genetic parameters and genomic selection accuracy. **Crop Science**, v. 54, p. 1115-1123, 2014.

POLLAK, J. **SireMatch version 2.0.2**. Computer Program, Cornell University, Ithaca, NY, 2006.

RON, M. et al. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implication for Genetic Improvement. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 676-681, 1996.

SABIR, J. et al. Applying molecular tools for improving livestock performance: From DNA markers to next generation sequencing technologies. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 12, p. 541-553, 2014.

SOUSA, G. G. T. et al. Environmental factors and genetic parameters for reproductive characteristics of Nelore in the through northern region from Brazil. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 16, n. 2, p. 290-299, 2015.

VAN EENENNAAM, A. L. et al. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3159-3169, 2007.

VAN EENENNAAM, A. L.; WEBER, K. L.; DRAKE, D. J. Evaluation of bull prolificacy on commercial beef cattle ranches using DNA paternity analysis. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 2693-2701, 2014.

YOKOO, M. J. et al. Reproductive traits and their associations with other economically important traits in Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 1, p. 91-100, 2012.

CAPITULO II

7 COMPARAÇÃO DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE PAINÉIS DE SNP PARA REALIZAÇÃO DE TESTE DE PATERNIDADE

RESUMO

A qualidade da informação do arquivo de pedigree, onde a relação de parentesco dos animais é determinada, deve ser um dos focos principais dentro de qualquer programa de melhoramento genético ou propriedade rural que se destina à uma produção eficiente. Para isso estão sendo disponibilizados no mercado opções de testes de verificação e confirmação de parentesco animal com o objetivo de atribuir um parentesco desconhecido ou validar o mesmo. Os marcadores moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) têm ganho cada vez mais espaço em estudos e aplicações nos processos de seleção genômica por diversas vantagens, entre elas, custo e capacidade de automação e padronização laboratorial. E por isso, estão também sendo cada vez mais utilizados nas verificações de paternidade através de painéis de marcadores de grande densidade (milhares de marcadores) ou mesmo através de um grupo pequeno de marcadores (centenas de marcadores) com função exclusiva para o teste. Para a raça Nelore já existem painéis de diferentes marcadores sendo utilizados de maneira comercial ou sendo propostos por órgãos internacionais como o ISAG (*International Society for Animal Genetics*). Dessa maneira, objetivando testar novas possibilidades e verificar o contraste com painéis que veem sendo proposto para o tipo SNP de marcador, foram identificados que com números pequenos de SNPs é possível atribuir a paternidade de animais sem informação de pedigree e que a seleção do painel ISAG de 195 SNPs se mostrou eficiente para a determinação dessa informação na população analisada e que a adição desses marcadores em pequenos painéis de seleção genômica também podem servir como estratégia para o uso dessa ferramenta por grupos independentes ou mesmo estendendo às associações de raça.

Palavras-chave: Paternidade, marcador molecular, painel, Nelore, ISAG

ABSTRACT

Today any cattle breeding program or rural farm that intends to maintain efficient production, must focus on the quality of their herd's pedigree as it determines to the family matrix relationship of the animals. For this reason, there are test options on the market whereby parentage can be assigned or validated when it is not known. The single nucleotide polymorphisms molecular markers have been well recognized as an effective test method in research and genomic selection applications. It offer several advantages, namely cost, automation capabilities and laboratory standardization. For the same reason, SNPs are increasingly used in paternity verification through dense markers panels (thousands of markers) or even through a small group of markers (hundreds of markers) with unique function for testing. Panels of different markers for commercial use or panels like those proposed by international groups such as ISAG (International Society for Animal Genetics) already exist for the Nellore breed. In this study, we have identified that with small numbers of SNPs it is possible to assign animal paternity without pedigree information. In addition, the ISAG panel with 195 markers was efficient to determine this information in the population analyzed and if the use of these markers in small genomic selection panels could serve as a cost effective tool to independent groups or breed associations.

Keywords: Paternity, molecular marker, panel, Nellore, ISAG

7.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne do mundo. Segundo a FAO (2013) o rebanho estimado é de 217.399.800 cabeças e só no ano de 2012 foram abatidas mais de 40 milhões. Pensando nesse cenário produtivo de grande potencial para crescimento e também para melhoria da qualidade produto ofertado no mercado, os programas de melhoramento genético possuem um papel importante no cenário de produção de carne brasileira. As primeiras atividades para trabalhar com seleção animal foram iniciadas nos anos 80 e atualmente, somente na raça Nelore, podem ser citados por volta de 10 diferentes grupos de melhoramento genético trabalhando em paralelo (Carvalho, 2013).

O que pode parecer uma perda para o desenvolvimento da raça, pode ser benéfico aos produtores, que por sua vez, uma vez escolhido o programa de melhoramento que está mais próximo dos seus objetivos de seleção, as fazendas passam a gerenciar as informações zootécnicas de uma maneira mais segura e com um maior nível de controle e coleta.

A correta identificação de paternidade é um fundamental requerimento para o sucesso de programas de melhoramento genético para melhoria das estimativas dos valores genéticos (STRUCKEN et al., 2014). Contudo, erros nessa identificação podem acontecer por diversas razões e assim, penalizar a qualidade dos dados estimados e prejudicar o trabalho de seleção e produção das fazendas que trabalham na pecuária.

Tanto a paternidade quanto a reconstrução de pedigree podem ser atribuídas através de um teste de DNA, como por exemplo, utilizando marcadores do tipo SNP, (HAYES, 2011) e funcionam muito bem se esses marcadores são suficientemente polimórficos (JONES et al., 2010). Pensando em corrigir e assegurar a qualidade dessa informação, a ISAG (*International Society for Animal Genetics*) criou um painel de marcadores do tipo SNP para raças taurinas de uso internacional afim de poderem ser comparados entre os laboratórios. (ISAG 2012). E mais recentemente, apresentaram um painel adicional de 100 marcadores, com potencial utilização para outras raças zebuínas, por possuir um maior poder de exclusão e que foram selecionados a partir dos painéis Illumina LD, HD e 50K com critério de MAF média de 0.4 e uma distância mínima de 10cM em todos os cromossomos, mas que precisam ser validados para raças zebuínas como foram para taurinas (ISAG 2013).

Já existem na literatura diferentes propostas para a escolha de painéis de marcadores em diferentes espécies, principalmente em bovinos, que variam de uma simples exclusão, alocação categórica, alocação fracional e reconstrução parental (JONES et al., 2010). Fisher et al. (2009) demonstrou que um painel com 40 marcadores do tipo SNP poderiam ser usados para determinar a paternidade se fossem utilizadas informações de acasalamento e data de nascimento dos animais.

Com o maior uso de ferramentas de seleção que utilizam os SNPs como base de genotipagem, principalmente por associações de raças com grandes volumes de animais, como a Holandesa e a Angus, o teste de paternidade que utiliza esse tipo de marcador foi adotado, pois além das vantagens já apresentadas, o criador passar a ter um reduzindo valor de investimento por utilizar uma única tecnologia. Contudo, outras raças expressivas, com a Nelore ou mesmo outras menores ainda utilizam painéis de microssatélites para a realização das verificações de parentesco.

McClure et al. (2012), com o objetivo de reduzir os custos de investimento na transição do uso da tecnologia (MS para SNP), propuseram uma metodologia de imputação de MS para SNP através da formação específica de haplótipos em 4 raças leiteiras (Holandês, Pardo-Suiço, Jersey e Guernsey) e encontraram que 17% dos haplótipos MS-SNP estavam preservados em algumas raças, indicando que ao mesmo tempo que os haplótipos são específicos por raça, ainda existe uma presença comum em raças distantes geneticamente, provavelmente por ancestrais comuns. Posteriormente, outros haplótipos foram reportados com o objetivo de criar um painel referência para a maioria das raças taurinas e zebuínas, para uso global, e os resultados mostraram uma alta acurácia para a imputação MS-SNP (MCCLURE et al., 2013). Mais especificamente para a raça Nelore, Souza (2013) obteve precisão de 99% para a imputação de dados de 9 MS, recomendados pelo ISAG, para um painel de 224 SNPs na verificação de parentesco de um conjunto de 227 animais. Por mais que a transição de um painel MS para SNP seja trabalhosa e leve tempo, existe a indicação que isso não tardará a acontecer em animais das raças zebuínas.

No Brasil o órgão que regulamenta o teste de paternidade é o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, MAPA, que em 2004 publicou a Instrução Normativa Nº74, atualizada posteriormente pela Instrução Normativa Nº 17 (2012), passou a normatizar para bovinos o teste de verificação de parentesco regulados internacionalmente pelo ISAG, com o objetivo de preservar a autenticidade dos registros genealógicos. Segundo a normativa, cada animal deve ser genotipado com um mínimo de doze locus microssatélites descritos: BM1818; BM1824; BM2113; ETH10; ETH225; ETH3; INRA23; SPS115; TGLA122; TGLA126; TGLA227 e TGLA53 (DOA, 2012).

Em contrapartida, os SNPs são preferidos aos microssatélites para verificações de paternidade e seleção genômica por conta da alta acurácia e velocidade de genotipagem, baixo custo por genótipo e fácil automação do processo (MCCLURE et al., 2013).

Assim, considerando essa preferência e a tendência de substituição dos marcadores microssatélites para SNP no decorrer do tempo nos testes de paternidade, o objetivo desse estudo foi o de comparar diferentes possíveis painéis de SNPs, no intuito de verificar e identificar os corretos pais dos animais testados da raça Nelore para uso comercial ou mesmo dentro de um processo de seleção genômica de um grupo de melhoramento específico.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Animais e banco de dados de genótipos

A população utilizada se restringe à animais da raça Nelore oriundos de programas de melhoramento genéticos distintos e que totalizaram 557 animais divididos em 468 produtos e 89 touros. Todos os produtos possuíam informação de pedigree tiveram suas paternidades confirmadas anteriormente pelo mesmo painel comercial descrito no capítulo 1 desse trabalho.

Todos os animais tiveram suas amostras genotipadas no painel *BovineHD Beadchip* da Illumina, contendo mais de 777 mil marcadores uniformemente espaçados no genoma bovino (ILLUMINA, 2015) e todas os processamentos foram conduzidos pelo laboratório americano da Neogen Corporation, GeneSeek, localizado na cidade de Lincoln no estado de Nebraska.

Os resultados das genotipagens foram recebidos eletronicamente e carregados no banco de dados do servidor do Grupo de Melhoramento de Animais e Biotecnologia (GMAB), na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

7.2.2 Painéis para o teste de paternidade

Conhecendo a importância do trabalho realizado pelo ISAG e pelo fato de que no Brasil o painel de marcadores MS utilizado atualmente foi instituído por esse grupo, foram utilizados os marcadores SNP sugeridos por ele para raças zebuínas e também outras combinações de um possível painel para seleção da característica produtiva de eficiência alimentar.

Os marcadores ISAG são divididos em dois grupos:

a) ISAG *Core*: contém 100 marcadores SNP definidos em 2011-2012, onde 5 marcadores não fazem parte do painel *BovineHD* da Illumina e por isso não puderam ser incluídos nas análises.

b) ISAG *Additional*: contém 100 marcadores SNP apresentados em 2012 como potenciais para serem utilizados em conjunto com o painel ISAG *Core* para animais das raças zebuínas.

Além desses dois painéis, 300 outros marcadores foram selecionados a partir de uma análise de GWAS, que objetivou a identificação de regiões associadas com eficiência alimentar (EA) e consumo alimentar residual (CAR) em 720 animais da raça Nelore. Esses marcadores foram aqueles que apresentaram um maior poder de explicação da variação genética nos

animais analisados. (SANTANA et al., 2014). Esses SNPs foram subdivididos em três grupos de acordo com a importância:

- c) P100: contém 100 principais marcadores para as características CAR/EA
- d) P200: contém 200 principais marcadores para as características CAR/EA
- e) P300: contém 300 principais marcadores para as características CAR/EA

Esses grupos de marcadores deram origem aos painéis utilizados nos testes de paternidade e foram organizados e combinados da maneira apresentada na Tabela 4:

Tabela 4 - Combinação dos diferentes grupos de marcadores para a formação dos painéis analisados nos testes de paternidade.

	ISAG Core	ISAG Additional	P100	P200	P300	Total de SNPs
ISAG Core	X					95
ISAG Core +100	X		X			195
ISAG Core +200	X			X		295
ISAG Core +300	X				X	395
ISAG Full	X	X				195
ISAG Full +100	X	X	X			295
ISAG Full +200	X	X		X		395
P100			X			100
P200				X		200
P300					X	300
ISAG Full +300	X	X			X	500

Para a formação dos grupos e extração dos animais e marcadores de interesse a partir do banco de dados geral de genótipos, foi utilizado comandos do PLINK, um programa aberto com foco principal em análises de dados genotípicos e fenotípicos (PURCELL et al., 2007). Os genótipos foram trabalhados no formato AA, BB, AB e 0 (valores perdidos), onde cada alelo foi colocado em uma coluna específica do banco de dados. A partir das saídas desse programa os subgrupos foram convertidos de arquivos de texto para arquivos com extensão csv para que o software de análise de paternidade pudesse importar e reconhecer os dados.

7.2.3 Análises de paternidade – SireMatch

Diversos softwares estão disponíveis para testes de paternidade de que vão desde os mais fáceis e práticos de serem usados, até os mais complexos que depende de um conhecimento maior de programação. Jones et al (2010) descrevem em uma revisão técnica vários desses programas e quais são suas vantagens e propósitos, funcionalidades e níveis de ajustamento dos possíveis erros (mutações, erros de genotipagem e os *null alleles*).

Blanchard (2013) trabalhou comparativamente com dois programas de análise de paternidade buscando a redução de marcadores em um determinado painel e encontrou algumas diferenças equilibradas entre o SireMatch 2.0 e o Cervus 3.0, porém sua análise final mostrou que ambos poderiam ser utilizados, provendo resultados muito similares.

O teste de paternidade foi conduzido e realizado utilizando o software SireMatch (POLLAK, 2006), de John Emil Pollak (diretor da US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE), por ser o programa usado nas análises comerciais do rebanho CFM através da empresa Neogen e também pelos relatados anteriormente.

O SireMatch requer um arquivo para cada painel de marcadores testado e nesse arquivo algumas colunas com informações específicas são necessárias para que ele possa rodar as análises. Além da coluna de identificação animal e das colunas de marcadores, uma coluna de classificação animal precisa ser apresentada e nela deve conter um ‘S’ (*sire*) para os potenciais touros, um ‘C’ (*calf*) para os produtos e um ‘D’ (*dam*) para as potenciais vacas, caso essas também estejam sendo usadas. Contudo, o programa só analisa um potencial parentesco por vez, sendo assim, uma rodada específica para as potenciais vacas deveria ter sido feita, caso elas também estivessem participando das análises. E assim foram criados dez arquivos, um para cada painel testado e com todos os animais selecionados, ou seja, todos os arquivos possuíam os mesmos animais e só distinguiam os marcadores desejados.

Uma vez aberto o programa e selecionado o arquivo de interesse, a primeira tela apresentou algumas opções de configuração nessa ordem: foi selecionado apenas uma linha de cabeçalho no arquivo importado; primeira coluna era a de identificação animal, segunda coluna era a de classificação do animal e todas as demais colunas eram marcadores genéticos. Na sequência, foi informado que valores de marcadores perdidos eram igual a zero e que o arquivo apresentava duas colunas por marcador, ou seja, uma coluna por alelo.

Na segunda página de configurações todos os marcadores foram identificados como SNPs e na página seguinte o sistema calculou as frequências alélicas para os touros da população em questão. Como configurações adicionais, a última página trouxe as opções de máximo de exclusões permitidas para que o touro fosse considerado na análise. E então, os resultados foram apresentados.

Como saídas do programa existiam cinco tipos de relatórios: *Calf Data Report*, onde todas as possibilidades de paternidade foram apresentadas, com probabilidades, número de exclusões (marcadores excluídos também foram apresentados) e número de marcadores comparados; *Compared Loci*, que continha a quantidade de marcadores comparados para cada combinação touro-produto; *Exclusions*, que continha a quantidade de marcadores excluídos comparados para cada combinação touro-produto; *Probabilities*, que continha a quantidade de marcadores comparados para cada combinação touro-produto; *Most Likely Sire Report*, que continha as opções de touro mais prováveis como pais.

O relatório utilizado para as comparações de painéis foi o *Calf Data Report* que permitiu utilizar critérios para a qualificação do possível touro como pai do produto.

Para cada um dos grupos testados, foram consideradas um mínimo de 80% dos marcadores passíveis de comparação entre os touros e produtos e foram aceitas até duas exclusões independentemente da quantidade de marcadores presentes no painel, ou seja, até duas incompatibilidades alélicas entre o produto e o touro. E para que um touro fosse considerado como qualificado como pai de um determinado produto, esse touro precisou seguir os seguintes critérios de porcentagem de probabilidade de ser o pai:

- a) De 100 a 90%: até duas exclusões
- b) De 89 a 85%: até uma exclusão

Esses critérios são os mesmos utilizados pelo painel comercial da Neogen Corporation e assim foram seguidos, buscando trazer para uma possível análise comercial.

Os resultados para serem considerados como corretos, foram comparados com o arquivo de pedigree (anteriormente já validado por teste de DNA) e as porcentagens de acertos foram analisadas entre os grupos considerados. Além disso, foram verificados possíveis falso-positivos e falso-negativos nas identificações de paternidade para os critérios utilizados. E para isso os resultados foram classificados em:

- 1) Determinado: touro sugerido como pai do produto está qualificado e confere com pai do pedigree;
- 2) Indeterminado: touro sugerido como pai do produto NÃO está qualificado e NÃO confere com o pai do pedigree;

3) Falso-determinado: touro sugerido como pai do produto está qualificado, mas NÃO confere com o pai do pedigree;

4) Falso-indeterminado: touro sugerido como pai do produto NÃO está qualificado, mas confere com o pai do pedigree.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os critérios para qualificação dos touros indicados como pais dos 468 produtos, podemos verificar na Tabela 5 que para todos os painéis que continham ao menos os 195 marcadores indicados pelo ISAG 100% dos animais tiveram um pai qualificado. Os painéis que continham ao menos os 95 marcadores ISAG *Core* também tiveram altas porcentagens para qualificação de touros como pais, variando de 92 a 97% de animais com paternidade identificada, mas o painel composto somente pelos 95 SNPs apresentou apenas 85% de paternidades qualificadas.

Para os demais painéis testados, os quais o critério de seleção dos marcadores foi apenas a eficiência no poder de explicação da variação genômica, a porcentagem de qualificação de touros como pais aumento de acordo com o aumento do número de marcadores no painel.

Tabela 5: Porcentagem de animais de acordo com a designação do touro sugerido como pai.

	Touro qualificado	Touro não qualificado
ISAG <i>Core</i>	85%	15%
ISAG <i>Core</i> +100	92%	8%
ISAG <i>Core</i> +200	93%	7%
ISAG <i>Core</i> +300	97%	3%
ISAG <i>Full</i>	100%	0%
ISAG <i>Full</i> +100	100%	0%
ISAG <i>Full</i> +200	100%	0%
ISAG <i>Full</i> +300	100%	0%
P100	40%	60%
P200	67%	33%
P300	83%	17%

Desmembrando os resultados encontrados e comparando os touros qualificados e não qualificados com as informações de pedigree e também, analisando a porcentagem de qualificações corretas, ou seja, aquelas que conferem com o pedigree, podemos observar pelo Figura 13, que os painéis que contem ao menos os 195 SNPs ISAG foram os que não tiveram ou que menos tiveram pais reconhecidos (determinados) e que diferiram dos pais informados no arquivo de pedigree. Em outras palavras, foram os painéis que reconheceram os pais dos animais com mais eficiência e de acordo com a informação base de pedigree.

Embora os painéis P100, P200 e P300 viessem melhorando a porcentagem de reconhecimento de paternidade com o aumento do número de marcadores, a quantidade de touros que divergiram do pai do pedigree variou de 17 a 28%. Esses touros que foram qualificados e que não correspondiam ao pai do arquivo de pedigree foram considerados como falso-determinados.

Dentro do processo de avaliação genética, pior que não identificar uma paternidade pode ser o fato de identifica-la erroneamente, dessa forma os resultados classificados como falso-determinado precisam também serem considerando num processo de validação de painel. Considerando isso, Strucken et al (2015) encontraram em média 0.6% de rejeições falsas, mas 55% de falsas determinações de parentesco considerando 1% de exclusões de marcadores.

Figura 13 - Gráfico de porcentagem de animais cujos touros qualificados como pais foram ou não determinados igualmente aos pais do pedigree

Determinado = touro sugerido como pai do produto está qualificado e confere com pai do pedigree; Falso-determinado = touro sugerido como pai do produto está qualificado, mas NÃO confere com o pai do pedigree.

Na Figura 14 podemos observar a porcentagem de animais que não tiveram um pai qualificado, ou seja, o pai é indeterminado pelo teste de paternidade, porém alguns touros descartados deveriam na verdade terem sido qualificados, e dessa forma foram considerados com falso-indeterminados.

O principal requisito para a utilização dos marcadores SNP em análise de paternidade é a obtenção de um painel com marcadores que tenha poder suficiente para identificar com acurácia a prole e seus respectivos progenitores dentro de populações onde a informação genealógica é escassa ou inexistente (HEATON et al., 2002). Jones et al (2010) ressaltaram que devido a possíveis erros de genotipagem e também por conta de mutações e alelos nulos (*null alleles*), a maioria dos estudos de exclusões devem considerar até dois loci incompatíveis antes da exclusão de paternidade ser considerada como válida.

Figura 14 - Gráfico de porcentagem de animais cujos touros não qualificados como pais foram ou não determinados igualmente aos pais do pedigree

Indeterminado = touro sugerido como pai do produto NÃO está qualificado e NÃO confere com o pai do pedigree;
Falso-indeterminado: touro sugerido como pai do produto NÃO está qualificado, mas confere com o pai do pedigree.

Um painel composto por SNPs adequados e selecionados para a finalidade de reconhecimento de paternidade pode apresentar um poder identificação superior a um painel de microssatélites. Hauser et al. (2011), compararam um painel com 80 SNPs com outro contendo

11 marcadores microssatélites para a identificação de paternidade em salmão e evidenciaram maior acurácia no painel de SNPs.

Com a fácil automatização dos painéis com SNP e também com o crescente uso da seleção genômica por parte dos criadores, atrelado com a redução dos custos de genotipagem, painéis de paternidade por SNP são uma forte tendência para as raças que ainda fazem uso dos microssatélites. E um outro ponto que deve ser ressaltado é a alta capacidade de comparação de dados originados em laboratório diferentes (KIJAS et al., 2009). E com tudo isso, reduzir os erros laboratoriais e que penalizam as interpretações dos resultados.

Contudo, existem outros fatores que podem interferir na qualidade dos testes de paternidade e que estão relacionados com erros no próprio processo de genotipagem, devido a existência de mutações, erros de genotipagem ou mesmo alelos nulos. Esses tipos de erros podem direcionar os resultados a uma exclusão de paternidade ou então aceitar uma falsa paternidade como verdadeira (WELLER et al., 2004).

A atribuição do número de marcadores necessário para um painel de paternidade deve considerar a porcentagem de erros de genotipagem que podem acontecer, porcentagem de falsas exclusões de parentesco atribuído, o custo-benefício da plataforma tecnológica utilizada para a genotipagem das amostras. De qualquer maneira, Strucken et al (2015), suportam o fato da recomendação do ISAG para aceitar o máximo de 1% de erros de genotipagem, ressaltando que valores menores impendem a habilidade de uma correta determinação de paternidade e valores maiores aumentam o risco de uma determinação errada.

De maneira geral, somente os primeiros 95 marcadores foram eficientes para determinar 82% das paternidades, mas o painel ISAG *Full* foi eficiente em 100% das determinações corretas, mostrando que 195 marcadores são capazes de atribuir o touro à sua progênie (Figura 13).

Marcadores escolhidos aleatoriamente podem ser tão bons quanto marcadores escolhidos cuidadosamente, contudo, quando são escolhidos os vieses podem ser minimizados, o que é extremamente importante em pequenos painéis. (STRUCKEN et al., 2015).

Paternidade é um teste imprescindível para quem participa de programas de melhoramento genético ou mesmo para os criadores que desejam verificar a produção de seus touros, seja, pela verificação do número de descendentes deixados ou por uma simples análise de dados fenotípicos, onde o produtor poderá selecionar quais touros permaneceram em trabalho de monta e quais serão descartados. Contudo, com o advento e o aumento de pesquisas considerando seleção para características produtivas de maneira pontual, podemos concluir que um painel que contemple o teste de paternidade e adicionalmente tenha marcadores para a

seleção de uma característica produtiva, também pode ser uma boa estratégia, uma vez que esse painel conterá poucos marcadores e de acordo com as tecnologias vigentes, poderá apresentar um custo-benefício mais realístico às condições atuais.

Nesse estudo, os marcadores mais explicativos para as características CAR e eficiência alimentar, quando adicionados aos marcadores do painel ISAG *Full*, não reduziram a eficiência do painel de paternidade, e isso pode ser considerado pois segundo Strucken et al (2014), onde relata que painéis de marcadores adaptados só são indicados se esses marcadores foram selecionados para uma raça específica ou para raças muito próximas geneticamente e dessa forma, os únicos pontos que podem passar a serem considerados como limites para um painel são o número de marcadores e o benefício da atribuição da paternidade.

Contudo, deve-se ressaltar que embora muitos modelos estatísticos têm sido desenvolvidos, a obtenção de resultados seguros depende da especificação da população considerada e do poder de informação do marcador (GURGUL et al., 2013). Alguns estudos mostram que pequenos painéis, contendo de 17 a 54 SNPs podem possuir uma eficiência de 99% na exclusão do falso pai em análises de paternidade e que se a quantidade de marcadores, que podem ser excluídos durante o processo de qualificação de um possível touro como pai do animal, sair de 1 para 2 SNPs, maior também deverá ser a quantidade de marcadores usados no teste, podendo este requerer um aumento entorno de 45% (BARUCH; WELLER, 2008; SCHÜTZ; EKKEHARD; BERTRAM BRENIG, 2015; WERNER et al., 2004).

7.4 CONCLUSÃO

O sucesso de um painel de paternidade depende não só de uma alta confiabilidade do processo de genotipagem e interpretação dos resultados, mas também da qualidade dos marcadores selecionados buscando a obtenção do máximo de eficiência nas qualificações da relação touro-progênie.

Embora, atualmente sejam usados na certificação de paternidade marcadores do tipo microssatélites no Brasil, muitas associações internacionais já têm ou estão adotando os marcadores do tipo SNP nos painéis desse teste. Como existe uma tendência natural na padronização do uso de algumas das técnicas dentro do segmento produtivo, num futuro próximo os microssatélites poderão ser substituídos pelo SNP nos painéis de parentesco, onde serão necessários investimentos nas conversões de perfis genéticos de touros ou fêmeas cujas amostras não podem ser mais acessadas ou mesmo para viabilizar a transição da substituição de tecnologia.

Dentre as opções de painéis desse estudo, os painéis *ISAG Core*, *ISAG Full* e os que também eram compostos por eles tiveram um bom desempenho na determinação de paternidade dos animais considerados nessas análises de uma maneira geral, contudo, considerando o painel *ISAG Core*, o aumento de marcadores não só aumentou a quantidade de determinações corretas, mas também aumentou a quantidade de determinações falsas.

A seleção do painel *ISAG Full* se mostrou mais eficiente para a determinação da relação de parentesco na população analisada, mas outras sub amostragem de animais da raça Nelore devem ser consideradas à ponto de utilizar tal painel para toda a população. E um painel que alie eficiência e confiabilidade nos resultados versus um menor investimento, também serão fatores importantes para que essa nova tecnologia seja adotada e aceita pela comunidade.

E dessa forma, o painel *ISAG Full*, que contém marcadores escolhidos com a finalidade de um teste de paternidade continua se mostrando nesse estudo como a melhor opção, pois embora outros painéis também tenho apresentado uma assertividade de 100% nos resultados, o aumento de marcadores pode causar um aumento nos custos dos testes.

7.5 REFERÊNCIAS

BARUCH, E.; WELLER, J. I. Estimation of the number of SNP genetic markers required for parentage verification. **Animal genetics**, v. 39, n. 5, p. 474-479, 2008.

BLANCHARD, K. **Analysis of Single Nucleotide Polymorphism Panels for Bovine DNA identification**. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Utah State University, Logan, 2013. Disponível em: <<http://digitalcommons.usu.edu/etd/1712>>. Acesso em: 12 ago 2014.

CARVALHEIRO, R. Genomic selection in Nelore cattle in Brazil. 2013. **10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**. Disponível em: <https://asas.org/docs/default-source/wcgalp-proceedings-oral/258_paper_10329_manuscript_1314_0.pdf?sfvrsn=2> Acesso em: 15 nov. 2015.

FAO. Livestock Primary. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

FISHER, P. J. et al. 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, p. 369-374, 2009.

GURGUL, A. et al. The evaluation of the usefulness of pedigree verification-dedicated SNPs for breed assignment in three polish cattle populations. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 6803-6809, 2013.

HAUSER, L. et al. An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. **Molecular Ecology Resources**, v.1, p. 150-161. 2011.

HAYES, B. J. Technical note: Efficient parentage assignment and pedigree reconstruction with dense single nucleotide polymorphism data. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2114-2117, 2011.

HEATON, M. P. et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and Paternity analysis in U.S. beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 272-281, 2002.

ILLUMINA, 2015. BovineHD beadchip datasheet. **Illumina**. Disponível em: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2015.

ISAG, 2012. Guidelines for cattle parentage verification based on SNP markers. **ISAG**. Disponível em: <<http://www.isag.us/Docs/Guideline-for-cattle-SNP-use-for-parentage-2012.pdf>>. Acessado em: 18 jan. 2015.

ISAG, 2013. ISAG cattle core and additional SNP panel. **ISAG**. Disponível em: <<http://www.isag.us/committees.asp?autotry=true&ULnotkn=true>>. Acessado em: 18 jan. 2015.

JONES et al. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology**, v. 10, p.6-30, 2010.

KIJAS, J.W. et al. A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. **PLOS ONE**, v. 4, p. e4668, 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004668>>. Acesso em: 14 out. 2014.

MAPA. Instrução Normativa Nº 17, de 09 de agosto de 2012. Alteração dos requisitos para execução dos testes de identificação genética animal pela análise do DNA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 ago. 2012. Disponível em: <http://anexos.datalegis.inf.br/arquivos/DO1_2012_08_10.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2015.

MCCLURE, M. C. et al. Imputation of microsatellite alleles from dense SNP genotypes for parentage verification across multiple *Bos Taurus* and *Bos indicus* breeds. **Frontiers in Genetics**, v. 4, a. 176, 2013.

MCCLURE, M. et al. Imputation of microsatellite alleles from dense SNP genotypes for parental verification. **Frontiers in genetics**, v. 3. a. 140, 2012.

POLLAK, J. **SireMatch version 2.0.2**. Computer Program, Cornell University, Ithaca, NY, 2006.

PURCELL, S. et al. PLINK- a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, 2007.

SANTANA et al. Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in Nellore cattle. **BMC Genetics**, 15:21, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/21>>. Acesso em: 08 out. 2015.

SCHÜTZ, EKKEHARD, AND BERTRAM BRENIG. Analytical and statistical consideration on the use of the ISAG-ICAR-SNP bovine panel for parentage control, using the Illumina BeadChip technology: example on the German Holstein population. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, 2015. Disponível em: <<http://www.gsejournal.org/content/47/1/3>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

SOUZA, M. A. de. Imputação de alelos microssatélites a partir de haplótipos SNP para verificação de paternidade na raça Nelore. 2013. 149 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-22032013-111330/pt-br.php>>. Acesso em: 14 ago 2014.

STRUCKEN, E. M et al. Performance of different SNP panels for parentage testing in two East Asian cattle breeds. *Animal Genetics*, v. 45, p. 572-575, 2014.

STRUCKEN, E. M et al. Performance of different SNP panels for parentage testing in two East Asian cattle breeds. **Animal Genetics**, v. 45, p. 572-575, 2014.

WELLER, J.I. et al. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2627- 2640, 2004.

WERNER, F. A. O. et al. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. **Animal genetics**, v. 35, n. 1, p. 44-49, 2004.

8 SUGESTÕES

Os estudos que objetivam a utilização de painéis de marcadores SNPs em testes de paternidade para raças zebuínas ainda são poucos, porém necessários para que uma futura implementação dessa nova tecnologia possa ser realizada de maneira efetiva e com um máximo de benefícios aos produtores. Novas populações devem ser consideradas em novos estudos assim como, painéis entre raças e aumentando o número de animais analisados.

ANEXOS

ANEXO A: Lista de marcadores SNP utilizados do painel ISAG Core

Nome do marcador SNP	Cromossomo	Localização
ARS-USMARC-Parent-DQ381153-rs29012842	1	3249057
ARS-USMARC-Parent-DQ451555-rs29010795	1	29524658
ARS-USMARC-Parent-DQ404150-rs29012530	1	59409838
ARS-USMARC-Parent-DQ404149-no-rs	1	99314925
ARS-USMARC-Parent-AY761135-rs29003723	1	127426647
ARS-USMARC-Parent-AY943841-rs17871566	1	138583183
ARS-USMARC-Parent-DQ404151-rs29019282	1	151349514
ARS-USMARC-Parent-DQ404152-rs29022245	2	5306838
ARS-USMARC-Parent-AY776154-no-rs	2	21560142
ARS-USMARC-Parent-DQ786757-rs29019900	2	111155237
ARS-USMARC-Parent-DQ647187-rs29010510	3	21146877
ARS-USMARC-Parent-AY842472-rs29001941	3	40399136
ARS-USMARC-Parent-AY842473-rs29001956	3	49703647
ARS-USMARC-Parent-AY842474-rs29003226	3	51976646
ARS-USMARC-Parent-DQ435443-rs29010802	3	58040470
ARS-USMARC-Parent-DQ489377-rs29026932	3	98188384
ARS-USMARC-Parent-DQ839235-rs29012691	3	116448759
ARS-USMARC-Parent-DQ647186-rs29014143	4	17200594
ARS-USMARC-Parent-AY842475-rs29002127	4	20181749
ARS-USMARC-Parent-DQ470475-no-rs	5	7651053
ARS-USMARC-Parent-DQ500958-no-rs	5	27825118
ARS-USMARC-Parent-DQ647189-rs29012226	5	63273386
ARS-USMARC-Parent-AY844963-rs17871338	5	98102349
ARS-USMARC-Parent-DQ468384-rs29003967	5	113137320
ARS-USMARC-Parent-DQ846688-rs29023691	5	119261609
ARS-USMARC-Parent-DQ647190-rs29013632	6	13897068
ARS-USMARC-Parent-DQ789028-rs29017713	6	46936182
ARS-USMARC-Parent-DQ888309-rs29013741	7	8272794
ARS-USMARC-Parent-DQ786758-rs29024430	7	18454636
ARS-USMARC-Parent-DQ650635-rs29012174	7	55116289
ARS-USMARC-Parent-DQ916057-rs29009979	7	81591587
ARS-USMARC-Parent-DQ786759-rs29026696	7	94259472
ARS-USMARC-Parent-DQ916058-rs29016146	8	1554706
ARS-USMARC-Parent-DQ650636-rs29024525	8	28799249
ARS-USMARC-Parent-AY850194-no-rs	8	59996431
ARS-USMARC-Parent-DQ837644-rs29010468	8	88974063
ARS-USMARC-Parent-DQ674265-rs29011266	8	106174871
ARS-USMARC-Parent-DQ786766-rs29012070	10	3530271
ARS-USMARC-Parent-DQ786761-rs29012840	10	44103665
ARS-USMARC-Parent-DQ984827-rs29012019	10	55611885
ARS-USMARC-Parent-DQ786762-rs29010772	10	81572252
<i>Continua.</i>		

Nome do marcador SNP	Cromossomo	Localização
<i>Continuação.</i>		
ARS-USMARC-Parent-DQ984825-rs29012457	10	98230479
ARS-USMARC-Parent-DQ837645-rs29015870	11	24553007
ARS-USMARC-Parent-AY851162-no-rs	11	46411100
ARS-USMARC-Parent-DQ837643-rs29018818	11	66341589
ARS-USMARC-Parent-AY851163-rs17871661	11	103047474
ARS-USMARC-Parent-DQ786763-rs29020472	12	11824653
ARS-USMARC-Parent-EF026087-rs29011643	13	1982209
ARS-USMARC-Parent-EF034081-rs29009668	13	25606469
ARS-USMARC-Parent-AY853302-no-rs	13	47397987
ARS-USMARC-Parent-AY853303-no-rs	13	75383374
ARS-USMARC-Parent-DQ846690-no-rs	14	10171919
ARS-USMARC-Parent-DQ984826-rs29027559	14	27751888
ARS-USMARC-Parent-DQ846691-rs29019814	14	48380429
ARS-USMARC-Parent-DQ846692-rs29010281	14	80082923
ARS-USMARC-Parent-EF042090-no-rs	15	21207529
ARS-USMARC-Parent-DQ866817-no-rs	15	38078775
ARS-USMARC-Parent-DQ866818-rs29011701	15	79187295
ARS-USMARC-Parent-DQ846693-rs29017621	16	9855276
ARS-USMARC-Parent-DQ888310-rs29012422	17	887216
ARS-USMARC-Parent-AY858890-rs29002256	17	29936157
ARS-USMARC-Parent-EF028073-rs29014953	18	1839733
ARS-USMARC-Parent-DQ916059-rs29009907	18	23426214
ARS-USMARC-Parent-AY914316-rs17871403	18	48812014
ARS-USMARC-Parent-DQ888311-rs29017313	19	8505317
ARS-USMARC-Parent-EF026084-rs29025380	19	15345312
ARS-USMARC-Parent-AY916666-no-rs	19	44799390
ARS-USMARC-Parent-EF164803-rs29011141	19	55174260
ARS-USMARC-Parent-DQ888313-no-rs	20	17837675
ARS-USMARC-Parent-AY919868-rs29002211	20	46066109
ARS-USMARC-Parent-DQ995976-no-rs	21	3088886
ARS-USMARC-Parent-EF093511-rs29012316	21	26620013
ARS-USMARC-Parent-DQ990832-rs29015065	22	11038205
ARS-USMARC-Parent-EF093509-rs29015170	22	22573121
ARS-USMARC-Parent-EF034082-rs29013532	22	56526462
ARS-USMARC-Parent-AY929334-no-rs	23	7219975
ARS-USMARC-Parent-AY937242-rs17872223	23	27306795
ARS-USMARC-Parent-DQ995977-rs29020834	24	1854953
ARS-USMARC-Parent-DQ990833-rs29010147	24	15447771
ARS-USMARC-Parent-AY939849-rs17870274	24	56415794
ARS-USMARC-Parent-EF034083-rs29018286	25	3126438
ARS-USMARC-Parent-AY941204-rs17872131	25	14683151
ARS-USMARC-Parent-DQ990834-rs29013727	26	8221270
ARS-USMARC-Parent-EF150946-rs29023666	26	13229219
<i>Continua.</i>		

Nome do marcador SNP	Cromossomo	Localização
<i>Continuação.</i>		
ARS-USMARC-Parent-EF034086-no-rs	26	38233337
ARS-USMARC-Parent-EF093512-rs29013546	27	15141319
ARS-USMARC-Parent-EF034084-rs29016185	27	21480570
ARS-USMARC-Parent-EF141102-rs29015783	27	37513923
ARS-USMARC-Parent-EF034085-rs29025677	28	5913226
ARS-USMARC-Parent-EF034087-no-rs	28	16097749
ARS-USMARC-Parent-EF026086-rs29013660	28	35331560
ARS-USMARC-Parent-EF042091-rs29014974	28	44261945
ARS-USMARC-Parent-AY856094-rs17871190	29	9160939
ARS-USMARC-Parent-EF034080-rs29024749	29	28647816
ARS-USMARC-Parent-DQ404153-no-rs	29	44756502
<i>Conclusão.</i>		

ANEXO B: Lista de marcadores SNP utilizados do painel ISAG Additional

Nome do marcador SNP	Cromossomo	Localização
ARS-BFGL-BAC-27364	1	8437530
ARS-BFGL-NGS-86662	1	40206017
BTB-01285245	1	63277846
BTB-01057979	1	114085424
ARS-BFGL-NGS-39978	2	5757355
ARS-BFGL-BAC-35552	2	12823369
Hapmap59876-rs29018046	2	13853729
Hapmap46653-BTA-47447	2	41938704
ARS-USMARC-Parent-AY841151-rs29003466	2	45832887
ARS-BFGL-NGS-67146	2	118773633
ARS-BFGL-NGS-38423	3	12709854
Hapmap39425-BTA-70290	4	10737673
BTB-01478115	4	42103377
BTB-00188171	4	57787437
Hapmap42648-BTA-71195	4	71061224
Hapmap49452-BTA-112834	4	72987997
ARS-BFGL-NGS-58613	4	78609385
Hapmap54547-rs29012198	4	110776624
BTA-73768-no-rs	5	67031023
ARS-BFGL-NGS-111053	5	72264603
ARS-BFGL-NGS-15506	5	88334676
Hapmap43142-BTA-107561	6	29556343
Hapmap51527-BTA-97415	6	44461834
ARS-BFGL-NGS-106015	6	61199572
BTB-01902778	6	114165533
ARS-BFGL-NGS-119662	6	118292328
Hapmap43057-BTA-80741	7	13279972
ARS-BFGL-NGS-27577	7	26066004
Hapmap60017-rs29023471	7	81668727
ARS-BFGL-NGS-101456	7	82825197
ARS-BFGL-NGS-15731	7	96936145
ARS-BFGL-NGS-72471	7	103375625
Hapmap55441-rs29010990	8	103137122
ARS-BFGL-NGS-14740	9	14436985
ARS-BFGL-NGS-93119	9	28149131
ARS-BFGL-NGS-31640	9	52430564
BTB-00394801	9	59383405
Hapmap54313-rs29012632	9	83320792
ARS-USMARC-Parent-DQ786765-rs29009858	9	98483346
ARS-BFGL-NGS-70946	10	14574453
BTB-00420215	10	44920804
<i>Continua.</i>		

Nome do marcador SNP	Cromossomo	Localização
<i>Continuação.</i>		
ARS-BFGL-NGS-111114	10	84446642
BTA-92021-no-rs	11	9385008
Hapmap40148-BTA-92999	11	36713471
BTA-11701-rs29017459	11	61989432
ARS-BFGL-NGS-76191	11	62732451
ARS-BFGL-NGS-117322	11	77884744
ARS-BFGL-NGS-42283	11	95543411
BTB-01980499	12	61345454
ARS-BFGL-NGS-112325	12	79643103
BTA-30857-no-rs	12	80058952
ARS-BFGL-NGS-112094	13	69187742
Hapmap43792-BTA-122725	13	83437845
ARS-BFGL-NGS-42505	14	62478242
ARS-BFGL-NGS-115514	15	38003134
BTB-01371672	15	50566485
BTA-37062-no-rs	15	51528617
ARS-BFGL-NGS-55943	15	64628706
ARS-BFGL-NGS-117319	16	12238539
ARS-BFGL-BAC-19454	16	13695211
Hapmap40729-BTA-40319	16	19882683
Hapmap47281-BTA-40051	16	72931875
ARS-BFGL-NGS-118319	17	9279323
ARS-BFGL-NGS-11383	17	12891997
ARS-USMARC-569	17	30360942
ARS-BFGL-NGS-99210	17	52740918
Hapmap51227-BTA-41809	17	67216420
Hapmap54020-rs29023153	18	6776532
ARS-BFGL-NGS-118340	18	26844474
ARS-BFGL-NGS-38620	18	64382705
Hapmap50598-BTA-122724	19	4670556
ARS-BFGL-NGS-36513	19	17236707
ARS-BFGL-NGS-57711	19	40692429
BTB-01416427	19	52911677
Hapmap36588-SCAFFOLD90561_9460	20	2289049
Hapmap46550-BTA-103548	20	30928803
ARS-BFGL-NGS-96125	20	58449212
ARS-BFGL-NGS-111076	21	21220448
Hapmap39461-BTA-109898	21	27927781
BTB-00818821	21	40408803
ARS-BFGL-NGS-26517	21	52139183
Hapmap31098-BTA-136127	21	62028408
ARS-USMARC-Parent-EF026085-rs29021607	21	65198296
ARS-BFGL-NGS-24419	22	11756783
<i>Continua.</i>		

Nome do marcador SNP	Cromossomo	Localização
<i>Continuação.</i>		
BTA-100621-no-rs	22	25598780
Hapmap43953-BTA-83292	22	54103673
Hapmap35535-SCAFFOLD86180_8791	23	41700829
ARS-USMARC-Parent-EF089234-rs29020870	23	50884052
Hapmap34424-BES10_Contig566_926	24	6408329
ARS-BFGL-NGS-114006	25	20114319
Hapmap41591-BTA-59790	25	27912102
ARS-BFGL-NGS-10035	26	39952154
Hapmap24215-BTA-163266	27	10764825
ARS-BFGL-NGS-102169	27	12930436
Hapmap51908-BTA-63031	27	41049981
Hapmap52240-rs29013844	28	20453054
ARS-BFGL-NGS-76330	28	33449126
UA-IFASA-5034	29	29052623
<i>Conclusão.</i>		