

## Utilização de ferramentas genômicas na pré-seleção de touros para o Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro<sup>1</sup>

Kevin Schefer dos Santos<sup>2,3</sup>, Sane Neves Barbosa<sup>3</sup>, Hyago Passe Pereira<sup>4</sup>, Rosana Isabel da Costa Nascimento<sup>3</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza<sup>5</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>6</sup>, João Cláudio do Carmo Panetto<sup>6</sup>, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva<sup>6</sup>, Marco Antonio Machado<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Parte do projeto "Seleção Genômica em Raças Bovinas Leiteiras no Brasil", liderado por Marcos Vinicius Gualberto B. Silva.

<sup>2</sup>Bolsista PIBIC CNPq.

<sup>3</sup>Graduando em Biologia - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF

<sup>4</sup>Mestrando em Biologia - Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>5</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

<sup>6</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite. E-mail: marco.machado@embrapa.br

<sup>7</sup>Orientador

**Resumo:** O Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro – PNMGL, uma parceria entre a Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro – ABCGIL e a Embrapa Gado de Leite, teve o início de seus trabalhos em 1985 com o objetivo de promover o melhoramento genético da raça para produção de leite. Com os recentes resultados das pesquisas em seleção genômica na Embrapa Gado de Leite, a ABCGIL e a Embrapa ofereceram aos seus associados, pela primeira vez em 2016, um "pré-teste genômico" que objetiva ranquear os candidatos a ingressarem na Prova de Pré-Seleção de Touros para o Teste de Progênie, favorecendo o processo de escolha dos melhores tourinhos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi utilizar ferramentas genômicas capazes de auxiliar o produtor na escolha dos melhores tourinhos a serem avaliados no teste de progênie de touros do PNMGL. Um total de 56 tourinhos, pertencentes a 15 criadores foram genotipados com o Neogen Z-CHIP e o valor genômico estimado (GEBV) para cada um. Os valores de GEBV foram utilizados para gerar um rank dos tourinhos para produção de leite, que foi eficiente para discriminar os animais enviados por cada produtor, permitindo a escolha dos candidatos com maior potencial para participação no teste de progênie da ABCGIL.

**Palavras-chave:** bovinos, genética molecular, melhoramento animal, zebuínos

### Use of genomic tools to pre-select bulls for the Brazilian Dairy Gir Genetic Improvement Program

**Abstract:** The Brazilian Dairy Gir Genetic Improvement Program (PNMGL), a partnership between the Brazilian Dairy Gir Breeders Association - ABCGIL and Embrapa Dairy Cattle, began its activities in 1985 with the objective of promoting the genetic improvement of the Gir breed for milk production. With the recent advances in the genomic selection research conducted at Embrapa, ABCGIL and Embrapa offered their associates, for the first time in 2016, a "genomic pre-test" that aims to rank the candidates to enter the pre-selection of bulls for the progeny test, favoring the process of choosing the best young candidates. Thus, the objective of this work was to use genomic tools in order to assist the producer in choosing the best bulls to be evaluated in the PNMGL sire progeny test. A total of 56 bulls belonging to 15 breeders were genotyped with the Neogen Z-CHIP and had their estimated genomic value (GEBV) calculated. The GEBV values were used to generate a rank of bulls for milk production, which was efficient to discriminate the animals sent by each producer and allowed the selection of bull candidates with the best potential for participating in the ABCGIL progeny test.

**Keywords:** bovine, molecular genetics, animal breeding, zebuine

### Introdução

O Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro – PNMGL, uma parceria entre a Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro – ABCGIL e a Embrapa Gado de Leite, teve o início de seus trabalhos em 1985 com o objetivo de promover o melhoramento genético da raça

para produção de leite. Além da avaliação genética para volume de leite, o Programa disponibiliza informações para características de composição do leite, conformação e manejo, além da genotipagem dos touros para os alelos da kapa-caseína, beta-lactoglobulina, beta-caseína e também para os alelos deletérios das doenças DUMPS, BLAD e CVM, fornecendo assim aos produtores, ferramentas moleculares importantes para sua utilização tanto na raça pura quanto em cruzamentos com outras raças leiteiras.

Visando a melhoria dos reprodutores que entram em Prova, a partir de 2009, ABCGIL, Embrapa e Fazu iniciaram uma nova etapa na evolução técnica do PNMGL, a Prova de Pré-Seleção de Touros para o Teste de Progênie. Nesta prova, são avaliadas características reprodutivas (congelabilidade, motilidade, defeitos maiores e menores, etc.) ligadas à produção comercial de sêmen nos tourinhos candidatos ao TP. Atualmente, além destas características seminais, estão sendo estudadas características funcionais, como temperamento, libido e característica de conformação.

Com os recentes resultados das pesquisas em seleção genômica na Embrapa Gado de Leite, a ABCGIL e a Embrapa ofereceram aos seus associados um “pré-teste genômico” que objetiva ranquear os candidatos a ingressarem na Prova de Pré-Seleção de Touros para o Teste de Progênie, favorecendo o processo de escolha dos melhores tourinhos.

O objetivo deste trabalho foi utilizar ferramentas genômicas capazes de auxiliar o produtor na escolha dos melhores tourinhos a serem avaliados no teste de progênie de touros do PNMGL.

## Material e Métodos

O DNA de 56 tourinhos da raça Gir Leiteiro foi extraído a partir de amostras de sangue, utilizando um protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001). A quantidade e qualidade das amostras de DNA foram determinadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Wilmington, DE, EUA) e também por meio de eletroforese em gel de agarose.

As amostras de todos os 56 tourinhos foram genotipadas utilizando o Z-Chip (Neogen, Lincoln, Nebraska, EUA) que foi especialmente desenvolvido pela sua subsidiária Deoxi (Araçatuba, SP, Brasil) para a genotipagem molecular de animais zebuínos, uma vez que os chips de DNA, desenvolvidos para taurinos, são pouco eficientes para as raças zebuínas.

Os valores genômicos para a produção de leite foram calculados utilizando os dados do Projeto “Seleção Genômica em Raças Bovinas Leiteiras no Brasil”, Código Embrapa 02.09.07.008.00.00, que vem sendo executado pela Embrapa desde 2011. Os resultados foram expressos em GEBV (Valor Genômico Estimado) e foram estimados com informações de todos os animais, com o fenótipo, pedigree e os genótipos em uma única etapa, por meio do procedimento conhecido por single-step GBLUP (ssGBLUP), usando inferência Bayesiana via amostragem de Gibbs, por meio do programa BLUPF90 (MISZTAL et al., 2002).

Uma amostra de 3.257 animais foi genotipada com chips de diferentes densidades (*Illumina BovineSNP50 BeadChip v2* (50K), *Illumina BovineHD BeadChip* (HD) e *Z-Chip*. Após a definição do *chip Illumina BovineHD BeadChip* como o padrão, os SNPs dos outros chips foram imputados, utilizando o *software Flmpute* (SARGOLZAEI et al., 2014) para o *chip* HD, sendo as análises iniciadas com um total de 735.236 SNPs. Posteriormente, os seguintes critérios foram utilizados para exclusão de SNPs: frequência alélica  $\leq 0,01$ , diferença máxima entre a frequência alélica observada e a esperada para o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* de 0,15, GenCall score  $\leq 0,70$ , *call rate*  $\leq 0,98$  e SNPs com correlação entre si  $> 0,995$ . Também foram excluídas amostras com eficiência de genotipagem (*call rate*)  $\leq 0,92$ . Desta forma, após o controle de qualidade, restaram 3.257 animais Gir genotipados e 450.078 SNPs em cromossomos autossômicos.

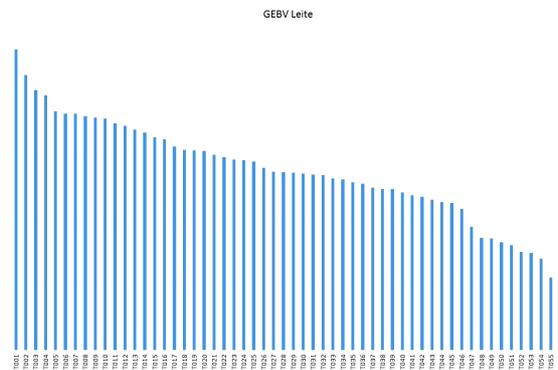
Os valores genômicos para produção de leite dos animais de cada produtor, participante do pré-teste genômico, foram plotados em gráficos de barra, utilizando o software Excel (Microsoft, Seattle, WA, EUA) e foram enviados a cada produtor.

## Resultados e Discussão

**Extração de DNA dos tourinhos:** Foram extraídas amostras de DNA de 56 tourinhos da raça Gir Leiteiro animais, utilizando sangue periférico como material biológico coletado e enviado por 15 produtores. As amostras de DNA obtidas apresentaram concentração média de  $452 \pm 303$  ng/uL, quantidade DNA média de  $226 \pm 151$ ; qualidade DNA média 260/280 de  $1,85 \pm$

0,02; qualidade DNA média 260/230 de  $2,27 \pm 0,22$ . Estes indicadores obtidos em relação às amostras de DNA indicam a excelência da metodologia de extração de DNA, uma vez que foram obtidas quantidades muito grandes de DNA de alta qualidade, suficientes e apropriadas para a realização de inúmeras análises moleculares e permitindo também armazenar o DNA no Banco de DNA de Bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite.

**Resultados das genotipagens com o Z-Chip e análises genômicas:** Problemas na integridade das amostras de DNA podem levar à falha de grande quantidade de SNPs, assim, tais amostras devem ser retiradas antes das análises. O *Call Rate* é um parâmetro importante para investigar a qualidade no DNA, indicando a eficiência da amostra. A média de *call rate* para as genotipagens usadas nesse estudo foi superior à 97%, indicando que a qualidade do DNA era excelente. Em relação às análises genômicas, a alta qualidade do DNA também foi fator decisivo para que o processo de imputação tivesse alta acurácia. A estratégia de genotipagem que o usa o HD SNP *chip* como o painel de referência e o *Z-chip* como painel de baixa densidade se mostrou bastante eficiente, com resultados de acurácia (eficiência da imputação) em torno de 98%. Essa alta eficiência na imputação, permitiu o uso de um número superior a 450.000 SNPs nas análises usando a metodologia *Single Step*, refletindo em ganhos nas confiabilidades associadas aos valores genômicos dos 56 tourinhos. Os resultados dos valores genômicos para os 56 tourinhos demonstraram que existe uma grande variabilidade entre os animais avaliados, sendo observada uma diferença de 419% entre o touro melhor classificado em relação ao touro pior classificado (Figura 1).

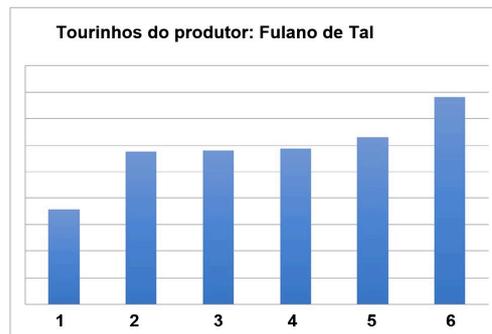


**Figura 1.** Classificação dos 56 tourinhos da raça Gir Leiteiro em relação ao valor genômico (VGBV) para produção de leite.

**Resultado final entregue a cada produtor participante da avaliação genômica:** Um total de 15 produtores participaram do processo do pré-teste genômico de touros da ABCGIL. O número de animais enviados por cada produtor variou de dois a seis tourinhos. Os valores genômicos, obtidos para cada um dos animais, permitiram ranquear os touros para cada proprietário, permitindo a escolha do animal com maior potencial genômico para produção de leite (Figura 2).

**Proprietário: Fulano de Tal**

Os resultados a seguir referem-se à comparação entre animais genotipados de um mesmo rebanho, por meio de seus valores genéticos para produção de leite, que foram estimados a partir de informações genealógicas, fenotípicas e genômicas. Os resultados não se prestam a qualquer tipo de comparação entre animais de diferentes rebanhos e não garantem que os animais melhores classificados, no gráfico abaixo, terão um desempenho superior caso participem do pré-teste e do teste de progênie do Gir Leiteiro. O objetivo da entrega desses resultados é que essa classificação auxilie os criadores a escolherem, dentre os animais disponíveis em seu rebanho, aqueles com melhor potencial genético para produção de leite, melhorando o processo de tomada de decisão quanto a qual (is) animal (is) poderá (ão) ser inscrito (s) no Teste de Progênie conduzido pela ABCGIL e pela Embrapa. É extremamente importante ressaltar que o resultado não é apropriado para ser usado como peça de promoção para a comercialização do próprio animal ou mesmo do seu sêmen.



**Figura 2.** Exemplo do resultado final entregue a cada um dos 15 produtores participantes da 8ª Prova de Pré-seleção para o Teste de Progênie ABCGIL/EMBRAPA.

## Conclusões

As amostras de DNA extraídas dos tourinhos apresentaram excelentes indicadores tanto em quantidade quanto em qualidade do DNA, garantindo a qualidade dos trabalhos posteriores. As genotipagens com marcadores SNP utilizando o *Z-Chip* da Neogen apresentaram excelente score de qualidade, com genótipos obtidos para quase a totalidade dos marcadores presentes no Chip. O ranqueamento dos tourinhos, em relação aos valores genômicos para produção de leite, foi eficiente para discriminar os animais enviados por cada produtor, permitindo a escolha dos candidatos com maior potencial para participação no teste de progênie da ABCGIL.

## Agradecimentos

Apoio financeiro: Embrapa, Fapemig, MCTI/INCT- Ciência Animal e Fapemig CVZ PPM 00606/16

## Referências

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 3ªed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SARGOLZAEI, M., J. P. CHESNAIS AND F. S. SCHENKEL. 2014. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. BMC Genomics, 15:478 (DOI:10.1186/1471-2164-15-478).

MISZTAL, I., TSURUTA, S., STRABEL, T., AUVRAY, B., DRUET, T., AND LEE, D. H. (2002). BLUPF90 and related programs (BGF90). In Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August, 2002. Session 28. (pp. 1-2). Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).