



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO E ASSOCIAÇÃO DOS GENES DA  
KAPPA-CASEÍNA E DA BETA-LACTOGLOBULINA COM A PRODUÇÃO DE  
LEITE EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

**ÍTALA IARA MEDEIROS DE ARAÚJO**

Zootecnista

**RECIFE-PE**

**2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO E ASSOCIAÇÃO DOS GENES DA  
KAPPA-CASEÍNA E DA BETA-LACTOGLOBULINA COM A PRODUÇÃO DE  
LEITE EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

**ÍTALA IARA MEDEIROS DE ARAÚJO**

**RECIFE - PE  
2013**

**ÍTALA IARA MEDEIROS DE ARAÚJO**

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO E ASSOCIAÇÃO DOS GENES DA  
KAPPA-CASEÍNA E DA BETA-LACTOGLOBULINA COM A PRODUÇÃO DE  
LEITE EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

**Área de concentração:** Produção Animal

**Comitê de Orientação:**

Orientador: Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa (UFRPE)

Co-orientadora: Pesq. Dra. Marta Fonseca Martins (Embrapa Gado de Leite)

**RECIFE-PE**

**2013**

Ficha catalográfica

A663c Araújo, Ítala Iara Medeiros de  
Caracterização do polimorfismo e associação dos genes da  
kappa-caseína e da beta-lactoglobulina com a produção de leite em  
bovinos da raça Girolando / Ítala Iara Medeiros de Araújo. – Recife,  
2013.  
74 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa.  
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2013.  
Referências.

1. Equilíbrio 2. Genes candidatos 3. Genotipagem 4. Qualidade  
de leite I. Barbosa, Severino Benone Paes, orientador II. Título

CDD 636

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

*Ítala Iara Medeiros de Araújo*, filha de Itamar Araújo da Silva e Iracema Medeiros da Costa Silva, nasceu em Açú-RN, no dia 07 de maio de 1987. Iniciou a graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em março de 2006, onde inicialmente foi bolsista do projeto de pesquisa “Estudo da estrutura populacional de rebanhos caprinos da raça Moxotó”, em seguida, foi monitora da disciplina de Anatomia Animal, bolsista de apoio técnico no Departamento de Agropecuária, aluna voluntária de Iniciação Científica em projetos de pesquisa e monitora de genética quantitativa e melhoramento genético, recebendo o título de Zootecnista em março de 2011. A partir de março de 2011, iniciou as atividades no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco na área de Produção Animal. Em 06 de fevereiro de 2013, submeteu-se à defesa de dissertação para obtenção do título de “*Magister Scientiae*” em Zootecnia.

## DEDICO

Aos meus pais, Itamar e Iracema, pelo amor incondicional e por terem acreditado e investido nos meus sonhos, junto comigo.

*“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”*  
(Bertrand Russell)

Ao meu querido irmão, Júnior, pela amizade e cumplicidade.

*“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família.”*  
(Leon Tolstói)

Ao meu namorado e melhor amigo, Diego Holanda, pelo amor, confiança, carinho e companheirismo a mim dedicados. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por acreditar veementemente no meu sucesso profissional! Tudo juntos, sempre juntos!

*“Duvides que as estrelas sejam fogo, duvides que o sol se mova, duvides que a verdade seja mentira, mas não duvides jamais de que te amo.”* (William Shakespeare)

*“Foram somente trinta dias  
Que não deu pra perceber  
Mas sei que para vocês  
Será difícil esquecer.*

*Onde quer que vocês estejam  
Por onde quer que passarem  
Vossa educação e simpatia  
A vitória é garantida por tudo, que vocês lutarem.*

*No currículo desta vida  
Cresceste mais e mais  
Pois esta renúncia é sentida  
Também pelos vossos pais.*

*Sei que tiveram momentos  
De lágrimas e soluços  
Sabiam também vocês  
Que fazia parte do percurso.*

*Agora prestes a terminar  
Mais uma parte da batalha  
Sabeis que isso tudo  
É parte de uma muralha.*

*Que Deus lhe dê muita força  
Ao longo desse caminho  
Sabendo vocês desde já  
Que Ele nunca vos deixa sozinho.*

*Que o vosso caminho sempre  
Seja coberto de luz  
Com proteção de Deus pai  
E o grande amor de Jesus.*

*Desejo-lhes todo sucesso  
Ao longo do vosso caminho  
Por onde quer vocês forem  
Não se esqueçam desse velhinho!”*

Por: Gerson – Porteiro do edifício Frankfurt – Juiz de Fora/MG

“Não fique triste quando ninguém notar o que fez de bom. Afinal, o sol faz um enorme espetáculo ao nascer e, mesmo assim, a maioria de nós continua dormindo.”

Charles Chaplin (1889-1977)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças para tirar as pedras do meu caminho, mas quando isso não foi possível, ensinou-me a contorná-las.

À minha família, pelo amor e paciência durante todos os anos da minha vida.

Ao Professor Severino Benone Paes Barbosa, pela orientação, paciência, incentivo, oportunidade e por sempre ter investido no meu crescimento científico.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Marta Martins e Marcos Vinícius, pelo empenho na pesquisa, apoio, confiança, conselhos, sugestões e ensinamentos que sempre me deram durante os dois meses e 15 dias que convivemos. Tenho como exemplo a competência e perseverança com as quais fazem ciência!

Ao pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Ary Freitas, e ao técnico da GIROLANDO, Wewerton, pela disponibilidade das planilhas e paciência na explicação de cada uma.

Ao professor Luciano Patto Novaes, pela confiança e estadia durante os dois meses de fase experimental da pesquisa em Juiz de Fora-MG.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Isabela Fonseca, Isabela Motta, Isabella Barreto, Willian e Alessa, pelos conselhos e ensinamentos e pela paciência com as análises.

À amiga Lili e aos amigos Leonardo e Wagner do Laboratório de Bioinformática da Embrapa Gado de Leite, sem me esquecer do grande amigo Dedi, pelos momentos de ensinamentos, lições de vida, amizade e descontração que me proporcionaram durante minha estadia em Juiz de Fora-MG.



Em especial, à grande amiga, companheira e irmã, Laís Aberrachid Jacopini, por todos os momentos alegres e nem tão alegres assim que passamos durante toda a etapa da nossa pesquisa.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por terem possibilitado a realização do Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - pela bolsa de estudos.

Aos meus educadores do mestrado que contribuíram com a minha formação, em especial ao professor Marcelo de Andrade Ferreira, pelo amor que tem à nutrição animal.

À toda minha turma do Mestrado, PROGENE e de Rural, pelos momentos de alegria e amizade compartilhada ao longo do curso.

Em especial, às amigas e companheiras do 1401 e do 1204, Stela Urbano e Juliana Paula, por todos os momentos de alegria e cumplicidade que passamos juntas!

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta pesquisa.

**O meu muito obrigada!**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
Resumo	17
Abstract	18
Introdução Geral.....	19
Referências Bibliográficas.....	21
Capítulo 1 - Referencial Teórico.....	23
Referências Bibliográficas.....	38
Capítulo 2 - Análise do polimorfismo e associação do gene <i>CSN3</i> com a produção leiteira em bovinos Girolando.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	52
Conclusões.....	56
Agradecimentos.....	56
Referências .....	56
Capítulo 3 - Estudo do polimorfismo e associação do gene <i>LGB</i> com a produção leiteira em bovinos Girolando.....	62
Resumo.....	63
Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	66

Resultados e Discussão.....	69
Conclusões.....	72
Agradecimentos.....	73
Referências.....	73

## LISTA DE TABELAS

### Referencial teórico

Tabela 1. Principais acasalamentos praticados dentro do Programa para formação da raça Girolando.....	25
Tabela 2. Número de rebanhos e de lactações, médias de produção de leite em 305 dias e total da primeira lactação, duração da lactação e idade ao primeiro parto (IPP) de vacas da raça Girolando no período de 2000 a 2011.....	26
Tabela 3. Comparação entre as sequências de aminoácidos das variantes A e B da $\beta$ -Lg, nas posições onde se verificam as diferenças.....	36

### Análise do polimorfismo e associação do gene *CSN3* com a produção leiteira em bovinos Girolando

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados no Teste de Progênie para amplificação do gene da kappa-caseína ( <i>CSN3</i> ).....	49
Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas do gene <i>CSN3</i> na população da raça Girolando.....	52
Tabela 3. Estimativas da substituição alélica ( $\alpha/2$ ) e <i>p-valor</i> associadas ao gene <i>CSN3</i> na população de vacas e touros da raça Girolando para a produção de leite.....	53

### Estudo do polimorfismo e associação do gene *LGB* com a produção leiteira em bovinos Girolando

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados no Teste de Progênie para amplificação do gene da beta-lactoglobulina ( <i>LGB</i> ).....	66
Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas do gene <i>LGB</i> na população da raça	69

Girolando.....

Tabela 3. Estimativas da substituição alélica ( $\alpha/2$ ) e p-valor associadas ao gene *LGB* na população de vacas e touros da raça Girolando para a produção de leite..... 70

## LISTA DE FIGURAS

### **Análise do polimorfismo e associação do gene *CSN3* com a produção leiteira em**

#### **bovinos Girolando**

Figura 1. Perfil genotípico do gene *CSN3* nos animais da raça girolando. Gel de agarose 2%: coluna X – marcador molecular de 100 pb; colunas 1 a 3, 5, 8, 10 a 14, 16, 17, 19 a 21, 23 a 28, 30, 32 a 37, 40 a 43, 46 e 47 – AA; colunas 4, 6, 7, 9, 15, 18, 22, 29, 31, 38, 39, 44 e 45 – AB; coluna 48 – BB..... 51

### **Estudo do polimorfismo e associação do gene *LGB* com a produção leiteira em**

#### **bovinos Girolando**

Figura 1. Perfil genotípico do gene *LGB* nos animais da raça Girolando. Gel de agarose 2,5%: coluna X – marcador molecular de 100 pb; colunas 9, 12, 16, 23, 24, 29, 32, 38 e 44 a 47 – AA; colunas 1, 2, 4, 6 a 8, 13, 14, 20 a 22, 25 a 28, 30, 31, 33, 36, 37, 39, 40 e 48 – AB; coluna 3, 5, 10, 11, 15, 17 a 19, 34, 35 e 41 a 43 – BB..... 69

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Associação Brasileira de Criadores
Ala	Alanina
Asp	Ácido Aspártico
ASSOLEITE	Associação dos Criadores de Gado de Leite do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba
CSN3	Gene da kappa-caseína
Da	Daltons
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
Gli	Glicina
GLM	Modelo Linear Geral
GIROLANDO	Associação Brasileira dos Criadores de Girolando
Hol	Holândes
IPP	Idade ao Primeiro Parto
LGB	Gene da beta-lactoglobulina
µl	Microlitro
nM	Nanômetro
ng	Nanograma
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMGG	Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando
PROCRUZA	Programa de Cruzamento Dirigido do Ministério da Agricultura
PS	Puro Sintético
PTA	Capacidade Prevista de Transmissão
P305	Produção de Leite em até 305 dias
RFLP	Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
U	Unidade
Val	Valina
$\chi^2$	Qui-quadrado

## RESUMO

Os genes candidatos da kappa-caseína (*CSN3*) e da beta-lactoglobulina (*LGB*) estão envolvidos na composição, processamento e qualidade do leite e estão ligados às características de produção. Objetivou-se avaliar as frequências alélicas e genotípicas do gene da kappa-caseína (*CSN3*) e da beta-lactoglobulina (*LGB*) e associá-las à produção de leite de bovinos participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando, por meio de análise das variáveis de produção de leite em até 305 dias (P305) e de capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite. Para o estudo do polimorfismo, foram genotipados 138 touros e 729 vacas (n = 867) para o *CSN3* e 131 touros e 737 vacas (n = 868) para *LGB*. Para a análise de associação foram avaliados 127 touros e 536 vacas (n = 663) para *CSN3* e 127 touros e 536 vacas (n = 663), para *LGB*. A diferenciação dos alelos A/B dos genes estudados foi obtida por meio da técnica de PCR-RFLP. As frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram estabelecidos por meio do programa Popgen versão 1.32 e testado pelo teste  $\chi^2$  ao nível de significância de 1%. O estudo de associação foi realizado por meio de análise de regressão utilizando o procedimento GLM do SAS 9.1. As frequências genotípicas e alélicas para o gene *CSN3* foram, respectivamente, 0,7324 (AA); 0,2468 (AB); 0,0208 (BB) e 0,8558 (A); 0,1442 (B) e para o *LGB* foram, respectivamente, 0,2604 (AA); 0,4827 (AB); 0,2569 (BB) e 0,5017 (A); 0,4983 (B). A população encontra-se em EHW para ambos os genes. Não foi detectada associação entre os genes avaliados e as variáveis analisadas.

**Palavras-chave:** equilíbrio, genes candidatos, genotipagem, qualidade de leite



## ABSTRACT

Candidate genes of the kappa-casein (*CSN3*) and beta-lactoglobulin (*LGB*) are involved in the composition, processing and quality of milk and are linked to production characteristics. This study aimed to evaluate the allele and genotype frequencies of kappa-casein gene (*CSN3*) and beta-lactoglobulin (*LGB*) and associate them with milk production of cattle participants Progeny Test Breed Girolando through analysis of variables milk yield in 305 days (P305) and predicted transmitting ability (PTA) for milk. For the study of polymorphisms were genotyped sires 138 and 729 cows (n = 867) for *CSN3* and 737 and 131 bulls and cows (n = 868) to *LGB*. For the association analysis were evaluated 127 bulls and 536 cows (n = 663) and 127 for *CSN3* bulls and 536 cows (n = 663) for *LGB*. The differentiation of allele A / B genes studied was obtained by PCR-RFLP. Allele frequencies, genotype and calculating the probability of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were established through the program Popgen versão 1.32 and tested by  $\chi^2$  test at a significance level of 1%. The association study was performed by regression analysis using the GLM procedure of SAS 9.1. The allele and genotype frequencies for the gene *CSN3* were, respectively, 0.7324 (AA), 0.2468 (AB) 0.0208 (BB) and 0.8558 (A) 0.1442 (B) and the *LGB* were, respectively, 0.2604 (AA), 0.4827 (AB) 0.2569 (BB) and 0.5017 (A) 0.4983 (B). The population is in HWE for both genes. No association was found between genes evaluated and analyzed variables.

**Keywords:** candidate genes, equilibrium, genotyping, milk quality

## INTRODUÇÃO GERAL

A bovinocultura leiteira se destaca como sendo um dos principais componentes do agronegócio do país e, cada vez mais, tem desempenhado relevante papel no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população brasileira.

Atualmente, a tendência mundial na criação de rebanhos comerciais se projeta para incrementar a produção e estabelecer sistemas de melhorias na composição e na qualidade do leite, visto que o destaque é sempre em relação à produção de maior qualidade nutricional para o consumidor e de maior rendimento para a produção de derivados pela indústria.

Tendo em vista que a competitividade no mercado de laticínios vem crescendo a cada dia, a qualidade e a quantidade dos constituintes do leite passam a ser o grande diferencial para as indústrias. Para os laticínios, os constituintes que representam maior valor econômico são, principalmente, a gordura e a proteína, pois esses são responsáveis pelas características físicas (estrutura, cor e sabor) e de rendimento do leite e de seus derivados (BRITO & DIAS, 1998; MADALENA, 1986).

Do ponto de vista nutritivo e industrial, as proteínas do leite de mais ampla aplicação e valor econômico são as caseínas e as proteínas do soro. A concentração de proteína total e a relação entre caseína e proteína de soro são muito variáveis entre as espécies. No leite de vaca essa relação é de aproximadamente 80% para caseína e 20% para as proteínas do soro, ao passo que no leite humano essa relação é inversa (LOURENÇO, 2000; SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2005).

Nos últimos anos, a inclusão da genética molecular tem possibilitado realizar a identificação e o mapeamento dos genes das frações proteicas responsáveis pelas variações na constituição do leite e desempenho no processo de industrialização,

facilitando, dessa forma, a seleção baseada na caracterização genotípica desejada (REGITANO & COUTINHO, 2001).

Técnicas utilizando marcadores moleculares são usadas no processo de seleção animal em programas de melhoramento genético, permitindo a determinação do potencial de um animal com maior precisão, uma vez que não são afetados pelo meio e podem ser utilizados precocemente, até mesmo na fase embrionária (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

No meio científico existe um número expressivo de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas com relação ao estudo dos genes que codificam as principais frações proteicas do leite (EMMONS et al., 2003). O polimorfismo destas proteínas, isto é, as diferentes formas sob as quais essas proteínas podem se apresentar, tem sido associado com diferenças na composição, no processamento e na qualidade do leite (McLEAN, 1987), visto que fornece excelente compreensão do comportamento da matéria-prima láctea durante o seu processamento industrial (LIN et al., 1986).

Com bases em indicações da literatura, os genes da kappa-caseína e da beta-lactoglobulina possuem alelos e genótipos que são correlacionados favoravelmente para maiores volumes de produção de leite. Viu-se, então, nesses genes, potenciais marcadores para o estudo de polimorfismo genético em bovinos e, assim, decidiu-se usá-los como genes candidatos para seleção de fenótipos e de genótipos superiores. Para tanto, seria necessário conhecer as proporções dos diferentes genótipos e dos distintos alelos destes genes na população por meio do estudo das frequências genotípicas e alélicas com o intuito de, futuramente, relacioná-las com os registros produtivos, visando uma possível associação desse gene com a produção de leite, auxiliando na seleção de animais geneticamente superiores dentro do rebanho.

Com isso, o presente trabalho objetivou caracterizar as frequências alélicas e genotípicas dos genes da kappa-caseína (*CSN3*) e da beta-lactoglobulina (*LGB*) e associá-las à produção de leite em animais da raça Girolando.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA/São Paulo: Tortuga, 1998. 88p.

EMMONS, D.B.; DUBE, C.; MODLER, H.W. Transfer of protein from milk to cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.2. p.469-485, 2003.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENAGEM. 220p, 1995.

LIN, C.Y.; McALLISTER, A.J.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F. – Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.69, p.704-712, 1986.

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep. Cap. 5, p.179-231. 2000.

MADALENA, F.E. **Economic evaluation for milk and beef production in tropical environments**. In: WORLD CONGRESS GENETIC APPLIED LIVESTOCK PRODUCTION. v.9, n.3, p.33-43. 1986.

McLEAN, D.M.; Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties. **Animal Genetics**, v.18, p.100-102, 1987.

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA, 213p. 2001.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 517 p., p.139-157. 1996.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.8, n.1 p. 43-56. 2005.

# **CAPÍTULO I**

## Referencial Teórico

## **1. A raça Girolando**

### **1.1. Histórico da raça**

De acordo com Silva et al. (2012), os primeiros cruzamentos da raça Holandesa com a raça Gir no Brasil surgiram na década de 1940. Deste cruzamento surgiu a raça Girolando que alia a alta capacidade de produção de leite do gado Holandês com a excelente rusticidade do Gir, ocorrendo, assim, complementaridade das duas raças em um único tipo de animal, fenotipicamente superior aos demais mestiços leiteiros. Esses animais se destacam pela excelente produtividade em ambientes tropicais e subtropicais, fertilidade e vigor (FREITAS et al., 2009; FREITAS, 2003).

Devido a essas características, a multiplicação desses animais foi acelerada e em pouco tempo já era o gado predominante na maioria dos currais brasileiros (GIROLANDO, 2012; SILVA et al., 2012), tornando-se um ecótipo socioeconomicamente importante para o país (FREITAS et al., 2005).

Em 1978 foi fundada, por um grupo de pecuaristas da região de Uberaba, a Associação dos Criadores de Gado de Leite do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (ASSOLEITE), que, por subdelegação da ABC (Associação Brasileira de Criadores), era a entidade encarregada de executar o PROCRUZA - Programa de Cruzamento Dirigido, do Ministério da Agricultura. Esse programa tinha como principal objetivo selecionar gado de leite e de corte em todos os graus de sangue (SILVA et al., 2011; FREITAS et al., 2005).

O Ministério da Agricultura, em 1988, decidiu encerrar o PROCRUZA. Durante os dez anos de programa, pelos relatórios conclusivos, o cruzamento Gir com o Holandês se destacou e era o mais praticado pelos criadores brasileiros (FREITAS et al., 2005).

Em 1989, a Assoleite obteve registro junto ao Ministério e passou a conduzir o programa de formação da Raça Girolando, passando a ser denominada Associação Nacional dos Criadores de Girolando. E, em 1996, com a oficialização da raça Girolando, a entidade passou a ser chamada Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (GIROLANDO), com sede em Uberaba, Minas Gerais (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2011; FREITAS et al., 2005).

## **1.2. Formação da raça**

Segundo a GIROLANDO (2012), atualmente não se cogita fazer comparações entre raças com espírito competitivo, mas sim de buscar as qualidades que cada uma tem a oferecer, em diferentes ambientes, para que se complementem buscando alcançar uma máxima eficácia econômica.


Foi pensando nessa complementaridade que se deu a formação da raça bovina Girolando, que, a princípio, teve por objetivo a criação de um grupamento étnico brasileiro capaz de produzir leite, em sistema produtivo economicamente viável, nas condições tropicais e subtropicais (FREITAS et al., 2005).

A raça, fundamentalmente produto do cruzamento do Holandês com o Gir, é composta por variados grupos genéticos, desde  $1/2$  Hol +  $1/2$  Gir até  $13/16$  Hol +  $3/16$  Gir (Tabela 1). No entanto, o direcionamento dos acasalamentos busca a fixação do padrão racial, no grau de  $5/8$  Hol +  $3/8$  Gir, objetivando um gado produtivo e padronizado que atenda as necessidades dos produtores de leite, sendo que animais advindos do acasalamento entre indivíduos  $5/8$  são considerados como Puro Sintético (PS), ou seja, a raça propriamente dita. Para um animal receber o registro definitivo de PS, além de ele ser produto do acasalamento entre animais  $5/8$ , o mesmo deve possuir



avaliação genética positiva para produção de leite (PTAleite), esta podendo ser obtida por meio do desempenho próprio ou pelo desempenho de seus pais (ABCG, 2012; SILVA et al., 2012).

**Tabela 1.** Principais acasalamentos praticados dentro do Programa para formação da raça Girolando

		MÃE							
		Holandês	7/8	3/4	5/8 ou PS	1/2	3/8	1/4	Gir
PAI	Holandês	X	X	7/8 (87,5%)	X	3/4 (75%)	F≈5/8 (68,75%)	5/8 (62,5%)	1/2 (50%)
	¾	7/8 (87,5%)	13/16 (81,25%)	3/4 (75%)	X	5/8 (62,5%)	F≈5/8 (56,25%)	1/2 (50%)	3/8 (37,5%)
	5/8 ou OS	13/16 (81,25%)	3/4 (75%)	F≈5/8 (68,75%)	PS (62,5%)	F≈5/8 (56,25%)	1/2 (50%)	7/16 (43,75%)	5/16 (31,25%)
	Gir	1/2 (50%)	7/16 (43,75%)	3/8 (37,5%)	X	1/4 (25%)	X	X	X

Fonte: Silva et al. (2012)

Percebe-se uma grande diversidade de grupos genéticos na formação do Girolando. Freitas et al. (2005), comentam que essa abrangência é importante para poder atender os grandes contrastes existentes em nosso país, tanto de clima como de níveis tecnológicos.

### 1.3. Desempenho Produtivo da raça

O Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando (PMGG), publicou no Sumário de Touros, no ano de 2012, o desempenho produtivo ao primeiro parto das 12.739 vacas com a composição racial variando de 2/8 a 7/8 Hol: Gir, controladas em 348 rebanhos colaboradores do teste de progênie, no período de 2000 a 2011, sendo neste último ano incluídas apenas as lactações iniciadas até o mês de outubro, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Número de rebanhos e de lactações, médias de produção de leite em 305 dias e total da primeira lactação, duração da lactação e idade ao primeiro parto (IPP) de vacas da raça Girolando no período de 2000 a 2011

Ano de parto	Número de rebanhos	Número de lactações	Produção de leite (kg)		Duração da lactação (dias)	IPP (meses)
			Em 305 dias	Total		
2000	39	473	3.657 ± 1.790	4.113 ± 2.303	299 ± 99	32,7 ± 5,2
2001	53	571	3.531 ± 1.572	3.916 ± 1.884	293 ± 92	33,7 ± 5,7
2002	55	584	3.430 ± 1.491	3.768 ± 1.898	282 ± 87	33,8 ± 6,1
2003	61	758	3.378 ± 1.612	3.749 ± 1.909	293 ± 91	33,1 ± 5,4
2004	62	735	3.634 ± 1.588	4.076 ± 1.884	305 ± 93	34,3 ± 5,5
2005	86	831	3.726 ± 1.571	4.106 ± 1.941	303 ± 94	35,9 ± 6,2
2006	94	1.035	3.666 ± 1.599	4.069 ± 2.062	292 ± 102	36,3 ± 5,5
2007	102	1.005	3.901 ± 1.813	4.292 ± 2.322	300 ± 91	36,4 ± 6,1
2008	113	1.305	4.331 ± 1.881	4.884 ± 2.535	316 ± 97	36,8 ± 5,9
2009	131	1.693	4.461 ± 1.972	4.966 ± 2.585	327 ± 118	36,2 ± 6,0
2010	171	2.262	4.061 ± 1.958	4.988 ± 2.741	300 ± 98	35,1 ± 6,2
2011	174	1.487	4.233 ± 1.962	4.349 ± 2.139	303 ± 94	34,0 ± 6,5
<b>Geral</b>	348	12.739	3.962 ± 1.840	4.447 ± 2.372	304 ± 99	35,1 ± 6,1

Fonte: Silva et al. (2012)

Pode-se observar que a média geral da produção de leite em 305 dias no período foi de 3.962 kg. As médias de produção de leite total e duração da lactação foram 4.447 kg e 304 dias, respectivamente, para idade média ao primeiro parto de 35,1 meses. Essas informações estão de acordo com o que Teodoro & Lemos (1992) comentam a respeito do cruzamento Holandês x Gir, de que o desempenho produtivo da raça Girolando é favorável às áreas tropicais do Brasil.

#### **1.4. Teste de progênie da raça**

O Teste de Progênie consiste na avaliação do valor genético dos reprodutores pelo desempenho de suas progênies. O valor genético corresponde a duas vezes o desvio de sua progênie em relação à média da população. Em termos mais simples, pode-se dizer que o teste de progênie é um teste de comparação de reprodutores, sendo básico para qualquer programa de melhoramento genético (PEREIRA, 2008).

O Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando (PMGG) vem sendo conduzido há 15 anos com a colaboração técnica da Embrapa Gado de Leite. O PMGG estrutura-se no controle leiteiro e uso da inseminação artificial nos rebanhos de criadores da raça para a realização do Teste de Progênie de Touros Girolando (SILVA et al., 2011).

O Teste de Progênie iniciou-se em 1997 e já foram testados 48 reprodutores integrantes dos sete primeiros grupos. Outros 82 reprodutores cujas doses de sêmen foram distribuídas no período de 2007 a 2012 integram outros seis grupos que se encontram em fase de teste (SILVA et al., 2012).

Para que o Teste de Progênie seja realizado é necessária a participação dos criadores para testar seus reprodutores e de outros criadores com interesse de inseminar

as matrizes de seu rebanho com sêmen dos touros inscritos no teste, ficando esses rebanhos conhecidos como rebanhos colaboradores e as matrizes que serão inseminadas com o sêmen codificado desses touros como matrizes colaboradoras (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2011; FREITAS et al., 2009).

Os reprodutores devem ser de procedência genética conhecida e serem selecionados por uma comissão técnica. Os critérios para seleção são especificados nas normas do regulamento de participação de touros no Teste de Progênie da Raça Girolando, sendo estes divididos em grupos conforme o ano de inscrição (SILVA et al., 2011).

Segundo Silva et al. (2012), o período compreendido entre a distribuição do sêmen codificado até a divulgação dos primeiros resultados do teste de progênie de um determinado grupo de touros é em média de seis anos. Esse tempo é devido a fatores como período de distribuição, utilização do sêmen pelos criadores, tempo de gestação das matrizes colaboradoras, idade ao primeiro parto, período de lactação das filhas dos touros e tempo para análise dos dados de controle leiteiro e de genealogia.

Os resultados obtidos são anualmente publicados no Sumário de Touros da Raça Girolando, onde são disponibilizados os valores genéticos dos touros testados. Esses valores genéticos são expressos pela Capacidade Prevista de Transmissão (PTA).

De acordo com Pereira (2008), PTA estima a superioridade ou inferioridade genética esperada, em cada lactação das futuras filhas de um dado reprodutor, quando comparadas com as companheiras de rebanho com mérito genético médio da raça. Assim, pode-se dizer que a PTA estima o potencial de um animal em transmitir aquela característica em particular para sua progênie. Como o reprodutor só transmite metade de sua herança genética para cada filho (a), então seu valor gênico, ou seu valor reprodutivo, é duas vezes a PTA.

## **2. Polimorfismo genético**

### **2.1. Conceituação**

Strachan & Read (2002) definem polimorfismo genético como sendo a variação genética na sequência de alelos, na sequência de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica, que ocorre com uma frequência maior que 1% na população.

Outra definição é dada por Alberts et al. (2011): quando duas ou mais sequências variantes de nucleotídeos coexistem em uma população e são relativamente comuns, elas são chamadas de polimorfismo.

Entende-se que um gene é polimórfico quando se caracteriza pela ocorrência de pelo menos duas formas alternativas com frequências superiores a 1%. Essas formas alternativas têm o nome de alelos, e da sua combinação resultam os genótipos dos indivíduos (BEJA-PEREIRA et al., 2003).

A presença de um polimorfismo pode implicar em mudança da função do gene e, por consequência, na sequência da proteína correspondente, levando a alterações no genótipo, contribuindo para variações fenotípicas entre os animais (LEWIN, 2001; MARANHÃO, 2000).

De acordo com Ferraz et al. (2006), o estudo de polimorfismo no genoma de espécies domésticas, mais especificamente em genes que estão relacionados a processos metabólicos, vem sendo utilizado por pesquisadores para correlacionar diferenças genéticas com características produtivas dos animais e assim identificar indivíduos geneticamente superiores.

Além disso, a existência de genes polimórficos no genoma dos indivíduos é um dos passos utilizados para identificar raças e/ou linhagens pela análise da sequência do DNA (OTAVIANO, 2006).

Sendo assim, a identificação de alelos polimórficos relacionados às características econômicas no sistema de produção, como, por exemplo, a produção de leite, pode levar o produtor a direcionar melhor os acasalamentos em seus rebanhos, para que haja, assim, uma frequência maior dos alelos polimórficos para as características desejadas. (OTAVIANO, 2006; MARANHÃO, 2000).

## **2.2. Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs)**

A forma predominante de polimorfismo é o SNP, sigla que deriva do termo em inglês *Single Nucleotide Polymorphism* (CHORLEY et al., 2008).

Os SNPs são mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina) na sequência do genoma (CAETANO, 2009), ou ainda podem ser conceituados como sendo sítios no genoma onde a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base (DE NARDIN, 2009).

Essas mutações podem ser substituições, deleções e adições de nucleotídeos, segundo Regitano & Coutinho (2001). As mais comuns são as de substituições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (Adenina e Guanina) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (Citosina e Timina). Menos frequentes são as trocas de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (CAETANO, 2009).

Os SNPs são atraentes para a análise genética por se encontrarem em praticamente qualquer região do genoma ou sequência de interesse, como, por exemplo, em *exons* de genes candidatos, podendo ter implicações diretas nas funções da proteína correspondente (REGITANO & COUTINHO, 2001). Eles podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são

encontrados em espaços intergênicos ou em regiões não codificadoras, sem função determinada. (CAETANO 2009; LI & SADLER, 1991; NICKERSON et al., 1998).

### **3. Marcadores Moleculares**

O termo marcador, segundo Ramalho et al. (2004), indica a função de identificar ou “etiquetar” alguma coisa.

Marcadores moleculares são utilizados no processo de seleção dos animais em programas de melhoramento e, conceitualmente, são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que serão herdadas geneticamente de modo mendeliano. Estes marcadores são locos que apresentam características detectáveis que diferenciam os indivíduos de determinada população, demonstrando variações individuais e entre grupos de animais (MENEZES et al., 2006).

O desenvolvimento de novas técnicas na área da biologia molecular tem facilitado o estudo da composição genética dos animais, tornando possível a realização da seleção de animais baseada em características genotípicas. Essas técnicas vêm sendo utilizadas, através do uso de marcadores moleculares, para estudar genes que afetam, dentre outras características, a produção de leite, por exemplo (KEMENES & COUTINHO, 2000). A vantagem do uso dos marcadores moleculares é que estes permitem a determinação do potencial de um animal com maior precisão, uma vez que não são afetados pelo meio ambiente e podem ser utilizados precocemente, até mesmo na fase embrionária (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

#### 4. A técnica de PCR-RFLP

Os marcadores detectados pela técnica de Polimorfismos do Comprimento do Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) são polimorfismos evidenciados pela fragmentação do DNA e se baseiam na presença de sítios de restrição para uma ou mais endonucleases de restrição na região amplificada do DNA molde que pode ser determinada por intermédio do processamento do produto pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (GARCIA, 1995).

A técnica da PCR baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência genômica alvo pela utilização, em geral, de um par de iniciadores, conhecidos como *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), que flanqueiam a região genômica que se pretende amplificar pela ação de uma enzima termo-resistente, em geral a *Taq* polimerase. Os passos envolvidos nesse processo são automaticamente executados em uma máquina denominada termociclador, e resumem-se nas seguintes etapas: 1) desnaturação: o DNA molde é aquecido a 95°C, fazendo com que o DNA, originalmente fita dupla, seja desnaturado em duas fitas simples; 2) anelamento: a temperatura abaixa até aquela considerada ótima para os *primers* que estão sendo usados no experimento (Nesta etapa, os *primers* se anelam a regiões homólogas do genoma); 3) polimerização: esta etapa é executada a 72°C, que é a temperatura ótima para a enzima *Taq* polimerase realizar a transformação do que era a princípio uma fita dupla de DNA em duas fitas duplas. Desse modo, ao final de 30 a 40 ciclos, ter-se-á mais de um bilhão de cópias da sequência alvo, permitindo que a partir de quantidades ínfimas de DNA genômico possa se proceder à análise completa dos mais diversos sistemas gênicos (PEREIRA, 2008).



A associação das duas técnicas, resultando em análises PCR-RFLP, tem a possibilidade de identificar polimorfismos das proteínas lácteas, detectando assim diferenças genéticas entre indivíduos, quando suas sequências específicas de DNA são distintas, tornando-se ferramenta importante em sistemas de produção que promovem melhoramento genético de rebanhos leiteiros (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

## **5. Genes candidatos**

Em programas de melhoramento, utiliza-se como alternativa para identificar marcadores moleculares a abordagem do gene candidato, ou gene principal (GARCIA, 2006). Coutinho et al. (2010) definem genes candidatos como sendo aqueles que possuem função biológica conhecida e que estão, de alguma maneira, envolvidos no desenvolvimento ou fisiologia de alguma característica.

Segundo Garcia (2006), embora a maior parte das características de interesse econômico seja de natureza quantitativa e, portanto, controladas por um pool de genes, acredita-se que existam certos genes que apresentem uma maior influência na expressão, sendo estes denominados de genes principais.

Estes genes podem ter seus polimorfismos detectados e, caso estejam associados a características importantes, podem ser usados em programas de melhoramento genético. Exemplos interessantes do uso desses genes candidatos é o gene do halotano em suínos, que está associado à qualidade da carne (LEDUR, 2001), o gene Fec em ovinos, associado à alta taxa de ovulação, e o gene miostatina ou gene da musculatura dupla, que controla uma característica de valor comercial, que é o desenvolvimento da massa muscular (REGITANO & COUTINHO, 2001).

Particularmente, no que diz respeito à produção de leite, genes como o da kappa-caseína (*CSN3*) e da beta-lactoglobulina (*LGB*) são associados na literatura com

diferenças na composição, no processamento, na qualidade e quantidade do leite. São, portanto, candidatos para o estudo de polimorfismo genético em bovinos e, assim, foram usados como genes candidatos para seleção de fenótipos e de genótipos superiores nesta pesquisa.

### **5.1. Gene da kappa-caseína (CSN3)**

A kappa-caseína ( $\kappa$ -cn) pertence ao grupo das caseínas, que são proteínas do leite secretadas pela glândula mamária. Elas constituem aproximadamente 78-82% das proteínas do leite e são subdivididas em quatro grupos; caseína- $\alpha$ S1, caseína- $\alpha$ S2,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína (FLORES & RICHARDSON, 1988). Essas proteínas e suas variantes vêm sendo estudadas extensivamente, e estão relacionadas com a lactação, composição do leite e eficiência de fabricação do queijo em especial a kappa-caseína que é responsável pela estabilidade das micelas, importante determinante das propriedades organolépticas dos produtos lácteos (KEMENES, 1996).

A hidrólise enzimática que ocorre na manufatura do queijo ou o tratamento térmico em temperaturas elevadas resultam na remoção ou dissociação da  $\kappa$ -cn da superfície das micelas, eliminando a estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo (SGARBIERI, 2005).

A  $\kappa$ -cn bovina, cuja estrutura primária foi determinada por Mercier et al. (1973), é codificada pelo gene localizado no cromossomo 6, apresenta 169 resíduos de aminoácidos e é polimórfico em todas as raças, com duas variantes mais comuns,  $\kappa$ -cn A e  $\kappa$ -cn B (RODRIGUES, 2006). A diferença na mobilidade eletroforética dessas duas variantes resulta da substituição do aminoácido 148 Asp - Ácido Aspártico ( $\kappa$ -cn A)

para Ala - Alanina ( $\kappa$ -cn B) no éxon IV. As diferenças entre os alelos A e B estão na substituição de aminoácidos na posição 136 e 148, gerado por mutação de base simples nesses códonos (ROGNE et al., 1989).

O gene da kappa-caseína bovina (*CSN3*) possui até o momento, 11 variantes descritas: A, A1, B, C, E, F1, F2, G, H, I e J (PRINZENBERG et al., 2008; CAROLI et al., 2009).

## **5.2. Gene da beta-lactoglobulina (*LGB*)**

A beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) é, quantitativamente, a principal proteína do soro de leite, representando cerca de 50% (FOX & McSWEENEY, 1998; SGARBIERI, 2004; HARAGUCHI et al., 2006).

É a principal proteína do soro de leite em ruminantes e porcos, não sendo encontrada em abundância no leite de muitas outras espécies, como, por exemplo, no leite humano e de roedores, nos quais é inexistente (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; WIT, 1998; HARAGUCHI et al., 2006). A alergenicidade atribuída às proteínas do leite está essencialmente associada a essa proteína, afetando cerca de 1%-2% de crianças com menos de dois anos, sendo algo compreensível, já que se trata de uma proteína inexistente no leite humano (TORRES, 1995).

De acordo com Hambling et al. (1992) e Torres (2005), a beta-lactoglobulina tem na sua estrutura primária 162 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 18.400 Da.

A função biológica desta proteína ainda não é bem conhecida, mas segundo Kontopidis et al. (2004), acredita-se que ela tenha um papel no metabolismo do fosfato na glândula mamária, no transporte da vitamina A e de outras moléculas hidrofóbicas,

como os ácidos graxos no trato gastrointestinal de neonatos. A síntese da  $\beta$ -Lg ocorre sob regulação da prolactina, nas células epiteliais da glândula mamária (LARSON, 1979).

De acordo com Rodrigues (2006), o gene que codifica a  $\beta$ -Lg localiza-se no cromossomo 11. Segundo a mesma autora, esta foi a primeira proteína a ter os polimorfismos evidenciados, em 1955, quando Aschaffenburg e Drewry observaram, por eletroforese em papel, em pH 8,6, duas bandas distintas denominadas  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2. Em 1957, a descoberta foi confirmada e o nome das bandas passou a ser A e B, de acordo com a mobilidade eletroforética.

Conforme Formaggioni et al. (1999), entre as raças da espécie bovina de maior interesse na exploração leiteira, já foram identificadas doze variantes genéticas da  $\beta$ -Lg (de A a J, W e Dr), sendo a A e B predominantemente investigadas e caracterizadas.

As diferenças na sequência dos 162 aminoácidos nas posições 64 e 118, que constituem as variantes A e B da  $\beta$ -Lg são ilustradas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Comparação entre as sequências de aminoácidos das variantes A e B da  $\beta$ -Lg, nas posições onde se verificam as diferenças

$\beta$ -Lg	Posição dos aminoácidos variáveis														
	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66...	116	117	118	119	120
<b>A</b>	Leu	Leu	Gln	Lis	Trp	Gln	Asn	<b>Asp</b>	Glu	Cis...	Ser	Leu	<b>Val</b>	Cis	Gln
<b>B</b>	Leu	Leu	Gln	Lis	Trp	Gln	Asn	<b>Gli</b>	Glu	Cis...	Ser	Leu	<b>Ala</b>	Cis	Gln

Fonte: Botaro (2007)

As diferenças entre os genótipos polimórficos da beta-lactoglobulina se expressam em pequenas variações estruturais, substituições de nucleotídeos, resultando em alelos específicos. Contudo, essas variações estruturais podem estar associadas a

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

propriedades físico-químicas significativamente diferentes (HILL et al., 1996), e serem usadas como marcadores genéticos em estudos de associações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 3ª ed. Porto Alegre: Art Med, 2011.

BEJA-PEREIRA, A.; LUIKART, G.; ENGLAND, P.R. et al. Gene culture co-evolution between cattle and human lactase genes. **Nature Genetics**, New York, v. 35, p. 311-313, 2003.

BOTARO, B. G. **Variantes genéticas de beta-lactoglobulina em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite**. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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.

CAROLI, A.M.; CHESSA, S.; ERHARDT G.J. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, vol. 92, n. 11, p. 5335-5352, 2009.

CHORLEY, B. N. et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. **Mutatin Research**, v. 659, p. 147–157, 2008.

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

COUTINHO, L. L.; ROSARIO, M. F.; JORGE, E, C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, p.123-147, 2010.

DE NARDIN, E. Genetic polymorphisms and immune responses. **Immunological Investigations**, v. 38, p. 198-202, 2009.

FERRAZ, A. L.; BORTOLOSSI, J. C.; CURI, R. A.; FERRO, M. I.; FERRO, J. A.; FURLAN, L. R. Identification and characterization of polymorphisms within the 5' flanking region, first exon and part of first intron of bovine GH gene. **Journal Animal Breed Genetics**, v.123, n.3, p.208-12, 2006.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CENAGEM. 220p, 1995.

FLORES, R.; RICHARDSON, T. Genetic engineering o the caseins to modify the behavior of Milk during processing a review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2640-2654, 1988.

FORMAGGIONI, P.; SUMMER, A.; MALACARNE, M.; MARIANI, P. [1999]. **Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus**. Univerità degli Studi di Parma. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, 1999. v. 19, p. 127-165. Disponível em: <<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>> Acesso em: 22 Mar. 2012.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

FREITAS, A. F. et al. A raça Girolando. In: CARVALHO, L. A. et al. **Tecnologia e gestão da atividade leiteira**. 1ª ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p. 155-168.

FREITAS, A. F.; COSTA, C. N.; MENEZES, C. R. A. et al. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando: Sumário de touros 2009**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. 45p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 133).

FREITAS, M. S. **Utilização de modelos de regressão aleatória na avaliação genética de animais da raça Girolando**. 2003. 89f. Tese (Doutorado – Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2003.

GARCIA, J. F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de embriões bovinos**. 1995. 172 p. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo

GARCIA, J. F. Utilização de Marcadores Moleculares para a Seleção. In: 2º Simpósio de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2006. **Anais...** Londrina, p.195-201, 2006.

GIROLANDO – **Associação Brasileira dos Criadores de Girolando**, 2012. Uberaba, MG. [Informações]. Disponível em: <[www.girolando.com.br](http://www.girolando.com.br)>. Acesso em: 08 set. 2012.

HAMBLING, S. G.; MCALPINE, A. S.; SAWYER, L. Beta-lactoglobulina. In: FOX, P. F. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry**. London: Elsevier Applied Science, v.1, p. 141-189, 1992.

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 479-488, 2006.

HILL, J. P.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; ANEMA, S. G.; OTTER, D. E.; PATERSON, G. R.; LOWE, R.; MOTION, R. L.; THRESHER, W. C. Effect of the bovine beta-lactoglobulin phenotype on the properties of beta-lactoglobulin, milk composition and dairy products. In: PARRIS, N. (Ed.). **Macromolecular interactions in food technology**. Washington: American Chemical Society, 1996. v. 650, p. 281-294. (ACS Symposium Series).

KEMENES, P. A. **A quantificação das frequências dos alelos “A” e “B” dos genes Kapa-caseína e Beta-lactoglobulina em algumas raças bovinas**. 1996. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KEMENES, P. O.; COUTINHO, L. L. Frequências dos alelos “A” e “B” dos genes de kappacasein e  $\alpha$ -lactoalbumina nas raças holandesa, nelore, gir e caracu. **Arquivos de Zootecnia**, v.1, p.190- 192, 2000.

KINSELLA, J.E. & WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food & Nutrition Research**, v.33, p.343-437,1989.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: beta-lactoglobulin: Binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.4, p. 785-796, 2004.

LARSON, B. L. Biosynthesis and secretion of milk proteins – Review. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.2, p. 161-174, 1979.



ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

LEDUR, M. C. Genoma do frango – Mapeamento de QTL. In: 38ª REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: 2001.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Art Med; 2001.

LI, W. H.; SADLER, L. A. Low nucleotide diversity in man. **Genetics**, v.129, p. 513-23, 1991.

MARANHÃO, A.M. **Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo no gene do GH como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos**. 2000. 38f. Dissertação (Mestrado - Nutrição e Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2000.

MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ MARTINEZ, A.; RIBEIRO, M.N. et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.4, p.1336- 1341, 2006.

MERCIER, J. C.; BRIGNON, G.; RIBADEAUDUMAS, B. Structure primaire de la caséine  $\kappa$  bovine. Séquence complète. **European Journal of Biochemistry**, v. 35, p. 222-235, 1973.

NICKERSON, D. A. et al. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. **Nature genetics**, v.19, p.223-40, 1998.

OTAVIANO, A.R. **Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino e bubalino**. 2006. 97f. Tese (Doutorado – Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2006.

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 5 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2008. 617p.

PRINZENBERG, E.M.; JIANLIN, H.; ERHARDT, G. Genetic variation in the K-casein gene (CSN3) of Chinese Yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus *Bos*. **Journal of Dairy Science**, vol. 91, n. 3, p. 1198-1203, 2008.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3ª ed. rev. Lavras: Editora UFLA, 2004.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA, 213p. 2001.

RODRIGUES, S. G. **Estudo das Frequências dos alelos A e B dos genes da kapacaseína e beta-lactoglobulina e suas associações com produção de leite em bovinos F1 girolando**. 2006. 30 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROGNE, S.; LIEN, S.; VEGARUD, G. A method for  $\kappa$ -casein genotyping of bulls. **Animal Genetics**, v.20, p. 317-321, 1989.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1 p. 43-56, 2005.

SILVA, M. V. G. B. et al. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando - Sumário de Touros - Resultado do Teste de Progênie - Julho/2012**.

ARAUJO, I. I. M. Caracterização do polimorfismo e associação dos genes...

Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 154).

SILVA, M. V. G. B. et al. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando - Teste de Progênie: Sumário de Touros 2011.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. 46 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 148).

STRACHAN, T.; READ, A.P. **Genética molecular humana.** 2ª ed. Porto Alegre: Art Med, 2002.

TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M. Cruzamientos de bovinos para producción de leche y carne. In: FERNÁNDEZ-BACA, S. **Avances em La Producción de Leche y Carne en el Trópico Americano.** 1 ed. Santiago de Chile: FAO, 1992. p. 209-260.

TORRES, D.P.M. **Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidospolissacarídeos.** 2005. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia/ Engenharia de Bioprocessos) - Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga.

WIT J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 597-608, 1998.

## CAPÍTULO II

### Análise do polimorfismo e associação do gene *CSN3* com a produção leiteira em bovinos Girolando<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

**1     Análise do polimorfismo e associação do gene CSN3 com a produção leiteira em**  
**2   bovinos Girolando**

3

4   Resumo - Objetivou-se avaliar as frequências alélicas e genotípicas do gene da kappa-  
5   caseína (*CSN3*) e associá-las à produção de leite de bovinos participantes do Teste de  
6   Progênie da Raça Girolando, por meio de análise das variáveis de produção de leite em  
7   até 305 dias (P305) e de capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite. Para o  
8   estudo do polimorfismo, foram genotipados 138 touros e 729 vacas (n = 867) e para a  
9   análise de associação foram avaliados 127 touros e 536 vacas (n = 663). A diferenciação  
10   dos alelos A/B do gene estudado foi obtida por meio da técnica de PCR-RFLP. As  
11   frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de equilíbrio de Hardy-  
12   Weinberg (EHW) foram estabelecidos por meio do programa Popgen versão 1.32 e  
13   testado pelo teste  $\chi^2$  ao nível de significância de 1%. O estudo de associação foi  
14   realizado por meio de análise de regressão utilizando o procedimento GLM do SAS 9.1.  
15   As frequências genotípicas e alélicas para o gene foram, respectivamente, 0,7324 (AA);  
16   0,2468 (AB); 0,0208 (BB) e 0,8558 (A); 0,1442 (B). A população encontra-se em  
17   EHW.

18

19   Termos para indexação: equilíbrio, frequência, genotipagem, seleção

20

21

22

23

**24 Polymorphism analysis and gene *CSN3* association with milk production in**  
**25 cattle Girolando**

26

27 Abstract - This study aimed to evaluate the allele and genotype frequencies of kappa-  
28 casein gene (*CSN3*) and associate them with milk production of cattle participants  
29 Progeny Test Breed Girolando through variable analysis of milk production in 305 days  
30 (P305) and predicted transmitting ability (PTA) for milk. For the study of  
31 polymorphism were genotyped 138 bulls and 729 cows (n = 867) and for the association  
32 analysis were evaluated 127 bulls and 536 cows (n = 663). The differentiation of allele  
33 A / B gene studied was obtained by PCR-RFLP. Allele frequencies, genotype and  
34 calculating the probability of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were established  
35 through the program Popgen versão 1.32 and tested by  $\chi^2$  test at a significance level of  
36 1%. The association study was performed by regression analysis using the GLM  
37 procedure of SAS 9.1. The allele and genotype frequencies for the gene were  
38 respectively 0.7324 (AA), 0.2468 (AB) 0.0208 (BB) and 0.8558 (A) 0.1442 (B). The  
39 population is in HWE. No association was found between the gene and *CSN3* variables.

40

41 Index terms: equilibrium frequency, genotyping, selection

42

43

44

45

46

47

48

49  
50

## INTRODUÇÃO

51

52 O estudo do polimorfismo no genoma de espécies domésticas vem sendo  
53 utilizado por pesquisadores para correlacionar genes que estão relacionados a processos  
54 metabólicos com características produtivas dos animais (Ferraz, 2006). De acordo com  
55 Maranhão (2000), o polimorfismo gênico pode refletir em alteração da função do gene,  
56 contribuindo para variações fenotípicas entre os animais.

57 O gene da kappa-caseína bovina (*CSN3*) possui até o momento 11 variantes  
58 descritas: A, A1, B, C, E, F1, F2, G, H, I e J (Prinzenberg et al., 2008; Caroli et al.,  
59 2009), sendo as mais frequentes a A e B.

60 O polimorfismo desse gene tem sido associado à diferença na composição,  
61 processamento e qualidade do leite e também tem sido ligado às características de  
62 produção. O alelo A do gene é o mais favorável para a produção de leite, enquanto o  
63 alelo B está associado à maior taxa de gordura e proteína e, por isso, o leite proveniente  
64 de animais com genótipo BB é mais indicado para a produção de derivados lácteos,  
65 contribuindo de 8 a 10% na composição. Animais heterozigotos apresentam rendimento  
66 intermediário (Lin et al., 1986; McLean, 1987; Bovenhuis et al., 1992; Emmons et al.,  
67 2003).

68 A identificação de alelos polimórficos e das proporções alélicas e genotípicas  
69 desse gene relacionado à produção de leite nos rebanhos pode levar o produtor a  
70 direcionar melhor os acasalamentos em seus rebanhos, para que haja assim, uma  
71 frequência maior do polimorfismo desejado para a característica.

72 Sendo assim, objetivou-se com o presente trabalho caracterizar as frequências  
73 alélicas e genotípicas do gene da kappa-caseína (*CSN3*) e associá-las à produção de leite  
74 em animais da raça Girolando.

## 75 MATERIAL E MÉTODOS

76

77 Para a genotipagem, foram coletadas amostras de sêmen e sangue de 138 touros e  
78 sangue de 729 vacas filhas desses reprodutores, ambos participantes do Teste de  
79 Progênie da Raça Girolando coordenado pela Associação de Criadores da Raça  
80 Girolando (GIROLANDO) em parceria com a Embrapa Gado de Leite. O material  
81 biológico utilizado nesta pesquisa representa a totalidade de amostras disponíveis até  
82 março de 2012 para o gene em estudo no banco de DNA da raça na Embrapa. As  
83 amostras foram coletadas pelos técnicos da Associação quando das visitas para o  
84 controle leiteiro ou de classificação linear dos animais. Os animais são provenientes de  
85 fazendas de diferentes localidades do Brasil, todas colaboradoras do Teste de Progênie  
86 da raça.

87 O DNA genômico foi extraído das células do sangue e do sêmen utilizando-se o  
88 DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as  
89 recomendações do fabricante. A quantificação e verificação da qualidade das amostras  
90 foram realizadas por espectrofotometria (Nanodrop<sup>®</sup>1000, Thermo Fisher Scientific  
91 Inc., Wilmington, USA).

92 As amostras de DNA extraídas foram submetidas à técnica de amplificação por  
93 PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores  
94 (*primers*) descritos por Barroso et al. (1998), e à técnica de PCR-RFLP para  
95 diferenciação das duas formas variantes, A e B (Tabela 1).

96



97 **Tabela 1.** Sequências dos *primers* utilizados no Teste de Progênie para  
 98 amplificação do gene da kappa-caseína (*CSN3*)

Gene	Sequência (5' → 3')
<i>CSN3</i>	F TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG R GCGTTGTCTTCTTTGATGTCCTTAG

99

100 Cada reação de PCR possuía um volume final de 25 µl, contendo as concentrações  
 101 de 1X de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 400 nM de  
 102 cada *primer* e 50 ng de DNA genômico. O programa de amplificação do material  
 103 genômico consistiu de um período inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35  
 104 ciclos sendo desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento do *primer* a 65°C por 1  
 105 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao fim desta etapa, foi realizada uma extensão  
 106 final a 72°C por 5 minutos. Para a amplificação, utilizou-se o termociclador GeneAmp  
 107 PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA).

108 Para distinguir as duas formas variantes do gene *CSN3*, 10 µl do produto da  
 109 reação de PCR foram digeridos com 5 U da enzima de restrição *Hinf* I (New England  
 110 Biolabs, Inc., Ipswich, EUA) em um volume final de 15 µl incubados, a 37 °C, por 4  
 111 horas, seguidos de um período de 15 minutos, a 65 °C, para inativação total da enzima.  
 112 O produto da digestão foi analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de  
 113 etídio para detecção dos genótipos.

114 As frequências alélicas e genotípicas e o cálculo da probabilidade de Equilíbrio de  
 115 Hardy-Weinberg (EHW) foram obtidas por meio do programa Popgen version 1.32  
 116 (Yeh et al., 1997). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas  
 117 observadas foi testada pelo teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 1%.

118 O estudo de associação do gene *CSN3* com a produção de leite foi realizado  
119 utilizando dados de produção de leite em até 305 dias (P305) e a capacidade prevista de  
120 transmissão (PTA) de leite.

121 Foram utilizados dados fenotípicos de produção de leite de 536 vacas advindos do  
122 serviço de controle leiteiro da GIROLANDO e que compõem o Arquivo Zootécnico  
123 Nacional de Gado de Leite, gerenciado pela Embrapa Gado de Leite. As estimativas de  
124 PTA para a produção de leite, utilizadas para a análise dos 127 touros e 536 vacas  
125 avaliadas, são provenientes da avaliação genética realizada pela Embrapa Gado de  
126 Leite.

127 Para os dados de PTA, o seguinte modelo de substituição alélica foi utilizado:

$$128 Y_{ij} = \mu + S_i + \beta x_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

129 no qual  $Y_{ij}$  é o valor relativo da PTA da filha  $j$  do touro  $i$ ;  $\mu$  é uma constante geral;  $S_i$  é o  
130 efeito fixo do touro  $i$ ;  $\beta$  é o coeficiente de regressão representando metade do efeito de  
131 substituição alélica ( $\alpha/2$ );  $x_{ij}$  é o número de alelos B (0,1 ou 2) no loco do gene *CSN3* na  
132 filha  $j$  do touro  $i$  e  $\varepsilon_{ij}$  é o efeito residual. As estimativas de PTAs foram ponderadas  
133 pelos valores das acurárias para obter estimativas de quadrados mínimos ponderados do  
134 efeito de substituição alélica.

135 Os dados de P305 foram analisados seguindo o seguinte modelo de efeitos fixos:

$$136 Y_{ijklm} = \mu + S_j + GC_k + CG_l + O_m + \varepsilon_{ijklm},$$

137 em que,  $Y_{ijklm}$  representa os dados de produção de leite da vaca  $i$ , filha do touro  $j$ ;  $\mu$  é  
138 uma constante geral;  $S_j$  é o efeito fixo do  $j$ -ésimo touro;  $GC_k$  é o efeito fixo  $k$ -ésimo  
139 grupo contemporâneo ( $k = 1, 2, \dots, 52$ ) (rebanho, ano de parto e estação de parto);  $CG_l$  é  
140 o efeito fixo da  $l$ -ésima composição genética ( $l = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ );  $O_m$  é o efeito do  $m$ -  
141 éximo genótipo ( $m = AA, AB, BB$ ) e  $\varepsilon_{ij}$  é o efeito residual.

142 O grupo de touros avaliados apresentou composição genética de 3/4 e 5/8 da raça  
143 Holandesa e o grupo de vacas apresentou a composição genética igual ou superior a 5/8  
144 da raça Holandesa.

145 O estudo de associação foi realizado por meio de análise de regressão, utilizando  
146 o procedimento GLM do SAS 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary).

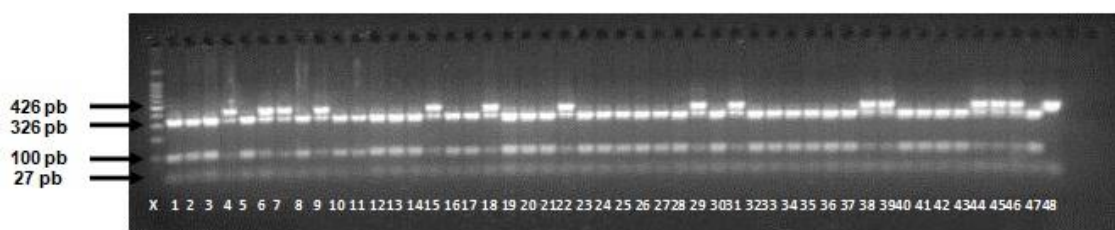
147

## 148 RESULTADOS E DISCUSSÃO

149

150 O produto da amplificação do gene *CSN3* gerou uma banda de 453 pb, com dois  
151 alelos polimórficos representados por quatro fragmentos de 426, 326, 100 e 27 pb, a  
152 partir da digestão enzimática do produto da PCR. O genótipo AA é identificado pela  
153 presença de três fragmentos (- 326, 100 e 27 pb), o AB é caracterizado pela presença  
154 dos quatro fragmentos e o BB apresenta apenas dois fragmentos (- 426 e 27 pb) (Figura  
155 1).

156



157

158 **Figura 1.** Perfil genotípico do gene *CSN3* nos animais da raça Girolando. Gel de  
159 agarose 2%: coluna X – marcador molecular de 100 pb; colunas 1 a 3, 5, 8, 10 a 14, 16,  
160 17, 19 a 21, 23 a 28, 30, 32 a 37, 40 a 43, 46 e 47 – AA; colunas 4, 6, 7, 9, 15, 18, 22,  
161 29, 31, 38, 39, 44 e 45 – AB; coluna 48 – BB

162

163 As frequências dos alelos A (0,8558) e B (0,1442) não estão igualmente  
 164 distribuídas na população para o gene *CSN3*, tampouco as frequências genotípicas. A  
 165 população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os  
 166 alelos A e B do gene a 1% de probabilidade visto que as frequências observadas e  
 167 esperadas não diferem entre si (Tabela 2).

168

169 **Tabela 2.** Frequências alélicas e genotípicas do gene *CSN3* na população da raça  
 170 Girolando

Genótipo	Número de Animais		Frequência		EHW
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
AA	635	634,9602	0,7324	0,8558 (A)	
AB	214	214,0796	0,2468		0,000120**
BB	18	17,9602	0,0208	0,1442 (B)	

171 \*\* P<0,01

172

173 Os resultados das frequências alélicas observados neste estudo estão de acordo  
 174 com os encontrados por Lima (2005), que, estudando 11 rebanhos leiteiros comerciais,  
 175 sendo cinco deles compostos por animais da raça Holandesa e seis compostos por  
 176 animais da raça Girolando, totalizando 1.350 vacas, verificou frequências alélicas de  
 177 0,82 (A) e 0,18 (B), e por Rodrigues (2006), que, estudando 70 vacas F1 da raça  
 178 Girolando, obteve frequências de 0,90 (A) e 0,10 (B) entre os animais. Quanto aos  
 179 resultados das frequências genotípicas, estes são similares aos encontrados por Lima  
 180 (2005), que obteve frequências de 0,67 (AA), 0,31 (AB) e 0,02 (BB), o que contrasta  
 181 com a distribuição relatada por Rodrigues (2006), que não constatou frequência para o

182 genótipo BB, enquanto que as frequências dos genótipos AA e AB foram de 0,80 e  
183 0,20, respectivamente.

184 Com base nos resultados obtidos, observa-se tendência à fixação do alelo A e,  
185 consequentemente, do genótipo AA nesta população, corroborando com outros  
186 trabalhos que mostram esta tendência para as raças zebuínas, como a Gir (Silva & Del  
187 Lama, 1997; Kemenes et al., 1999) e taurinas, como a Holandesa (Ng-Kwai-Hang et al.,  
188 1984; Lin et al., 1986). A baixa frequência do alelo B, que é associado a um maior  
189 rendimento para a produção de queijo, já era esperada uma vez que a frequência desse  
190 alelo em ambas as raças fundadoras também é baixa (Ng-Kwai-Hang et al., 1990;  
191 Famula & Medrano, 1994; Tsiaras et al., 2005; Azevedo et al., 2008).

192 A associação entre o gene *CSN3* e as variáveis PTA e P305 não foi significativa  
193 para os grupos avaliados de touros e vacas (Tabela 3). A estimativa do coeficiente de  
194 regressão para o número de cópias para o alelo B (metade dos efeitos da substituição  
195 alélica,  $\alpha/2$ ) indica que esse alelo não está relacionado com a produção de leite nas  
196 vacas e touros estudados, sendo que houve uma tendência no decréscimo da PTA (-  
197 14,16 kg). Para a P305, o número de cópias para o alelo B provocou um decréscimo (-  
198 62,93 kg) na produção de leite, embora não significativo.

199

200 **Tabela 3.** Estimativas da substituição alélica ( $\alpha/2$ ) e *p*-valor associadas ao gene  
201 *CSN3* na população de vacas e touros da raça Girolando para a produção de leite

Variáveis	Substituição alélica ( $\alpha/2$ )	<i>p</i> -valor
P305 (kg)	- 62,93	0,6924 <sup>ns</sup>
PTA (kg)	- 14,16	0,6179 <sup>ns</sup>

202 <sup>ns</sup>Não-significativo

203

204 A não significância da associação das variáveis com o gene também se assemelha  
205 aos obtidos por McLean et al. (1984), McLean et al. (1987), Aleandri et al. (1990), Ng-  
206 Kwai-Hang et al. (1990) e Tsiaras (2005), com vacas Holandesas.

207 Os resultados encontrados nesta pesquisa, quanto à relação da produção de leite  
208 com o alelo B, estão de acordo com os obtidos por Bovenhuis et al. (1992), que  
209 genotiparam 6.803 vacas Holandesas para o gene *CSN3* e determinaram que os animais  
210 de genótipo BB produziam menor quantidade de leite em relação as vacas AA, embora  
211 para estes autores os resultados tenham sido significativos. Em contrapartida, Rachagani  
212 & Gupta (2008) observaram em animais da raça Sahiwal, que os de genótipo BB  
213 produziram mais leite que os de genótipos AA e AB, estudo também significativo.

214 Os resultados conflitantes encontrados na literatura mostram que ora o alelo A  
215 (Gonyon et al., 1987; Bovenhuis et al., 1992), ora o alelo B (Lin et al., 1986,1989;  
216 Eenennaam e Medrano, 1991) estão sendo relacionados com maior produção de leite.  
217 De acordo com Ng-Kwai-Hang et al. (1990), este fato pode ser atribuído ao diferente  
218 número de amostras analisadas, diferentes linhagens e principalmente ao rigor das  
219 análises estatísticas.

220 Como todas as variantes da caseína estão localizadas na região do cromossomo 6,  
221 entre 200 e 300 kb, no braço q31 a 33, é grande o potencial, pela proximidade dos  
222 genes, do efeito de desequilíbrio de ligação. Entretanto, esse efeito dentro de uma  
223 família pode ser alterado em decorrência de diferenças entre locos de caseínas e outros  
224 genes de proteínas, o que poderia explicar as inconsistências observadas em estudos  
225 anteriores (Cowan et al., 1992; Braunschweig et al., 2000). Tais inconsistências  
226 também podem ser explicadas devido aos efeitos de ligação gênica, visto que vários  
227 autores demonstraram forte ligação entre a kappa-caseína e beta-caseína (Bovenhuis et  
228 al., 1992; Ikonen et al., 1999).

229

## CONCLUSÕES

230

231

1. A partir dos dados analisados pode-se dizer que a população estudada encontra-se em EHW para o gene *CSN3*.

232

233

2. O alelo B do gene *CSN3* não está associado à produção de leite em até 305 dias nem à capacidade prevista de transmissão de leite nos animais da raça Girolando analisados neste estudo.

234

235

236

237

## AGRADECIMENTOS

238

239

Ao Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa

240

Gado de Leite e Associação Brasileira dos Criadores de Girolando pela concessão dos

241

dados para realização desta pesquisa.

242

243

## REFERÊNCIAS

244

245

ALEANDRI, R ; BUTTAZZONI, L. G.; SCHNEIDER, J. C. The effects of milk

246

polymorphism on milk components and cheese-producing ability. **Journal of Dairy**

247

**Science**, v.73, p. 241-255, 1990.

248

AZEVEDO, A.L.S.; NASCIMENTO, C.S.; STEINBERG, R.S.; CARVALHO, M.R.;

249

PEIXOTO, M.G.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARÃES, S.E.;

250

MACHADO, M.A. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle.

251

**Genetics and Molecular Research**, v.7, n.3, p. 623-630, 2008.

- 252 BARROSO, A., DUNNER, S.; CAÑON, J. Technical note: detection of bovine kappa-  
253 casein variants A, B, C and E by means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand  
254 Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Animal Science**, v.76, p.1535-  
255 1538, 1998.
- 256 BOVENHUIS, H.; ARENDONK, J.A.M. van; KORVER, S. Association between milk  
257 protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.  
258 2549, 1992.
- 259 BRAUNSCHWEIG, M.; HAGGER, C.; STRANZINGER, G. Association between  
260 casein haplotypes and milk production traits of swiss brown cattle. **Journal of Dairy  
261 Science**, v.83, p. 1387-1395, 2000.
- 262 CAROLI, A.M.; CHESSA, S.; ERHARDT G.J. Milk protein polymorphisms in cattle:  
263 effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, vol. 92, n.  
264 11, p. 5335-5352, 2009.
- 265 COWAN, C. M.; DENTINE, M. R.; COYLE, T. Chromosome substitution effects  
266 associated with k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin in Holstein cattle. **Journal of Dairy  
267 Science**, v.75, p. 1097-1104, 1992.
- 268 EENENNAAM, A. V.; MEDRANO, J. F. Milk protein polymorphisms in Califórnia  
269 dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 1730-1742, 1992.
- 270 EMMONS, D.B.; DUBE, C.; MODLER, H.W. Transfer of protein from milk to cheese.  
271 **Journal of Dairy Science**, v.86, n.2, p.469-485, 2003.



- 272 FAMULA, T.R.; MEDRANO, J.F. Estimation of genotype effects for milk proteins  
273 with animal and sire transmitting ability models. **Journal of Dairy Science**, v.77,  
274 p.3153-3162, 1994.
- 275 FERRAZ, A. L.; BORTOLOSSI, J. C.; CURI, R. A.; FERRO, M. I.; FERRO, J. A.;  
276 FURLAN, L. R. Identification and characterization of polymorphisms within the 5'  
277 flanking region, first exon and part of first intron of bovine GH gene. **Journal Animal**  
278 **Breed Genetics**, v.123, n.3, p.208-12, 2006.
- 279 GONYON, D. S.; MATHER, R. E.; HINES, H. C. Association of bovine blood and  
280 milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.  
281 2585-2598, 1987.
- 282 IKONEN, T.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Association between milk protein  
283 polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows.  
284 **Journal of Dairy Science**, v.82, p. 1026-1033, 1999.
- 285 KEMENES, P. A.; REGITANO, L. C. A.; ROSA, A. J. M. k-casein, b-Lactoglobulin  
286 and Growth Hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá,  
287 caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. **Genetics and Molecular**  
288 **Biology**, v.22, n. 4, p.190-193, 1999.
- 289 LIMA, Y. V. R. **Variantes genéticas de kappa-caseína em vacas leiteiras e**  
290 **características físico-químicas e de composição do leite**. 2005. 84 f. Dissertação  
291 (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
292 Universidade de São Paulo, Pirassununga.

- 293 LIN, C. Y.; McALLISTER, K. F.; NG-KWAIHANG, K. F. Effects of milk protein loci  
294 on first lactation production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.704 -712,  
295 1986.
- 296 LIN, C. Y.; McALLISTER, K. F.; NG-KWAIHANG, K. F. Relationships of milk  
297 protein types to lifetime performance. **Journal of Dairy Science**, v.72, p. 3085 - 3090,  
298 1989.
- 299 MARANHÃO, A.M. Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo no gene do GH  
300 como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos. 2000. 38f.  
301 Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal), Faculdade de Medicina  
302 Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 303 McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic  
304 variants on milk yield and composition. **Journal of Dairy Research**, v.51, n.4, p. 531-  
305 546, 1984.
- 306 McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic  
307 variants and composition on heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v.54, p.  
308 219-235, 1987.
- 309 McLEAN, D.M. Influence of milk protein variants on milk composition, yield and  
310 cheese making properties. **Animal Genetics**, v.18, p.100-102, 1987.
- 311 NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES, H.G.; HAYES, J.F. Association between  
312 genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations.  
313 **Journal of Dairy Science**, v. 73, p.3414-3420, 1990.

- 314 NG-KWAIN-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E. Association of genetic  
315 variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by  
316 dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.835-840, 1984.
- 317 PRINZENBERG, E.M.; JIANLIN, H.; ERHARDT, G. Genetic variation in the K-casein  
318 gene (CSN3) of Chinese Yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3  
319 sequences in the genus *Bos*. **Journal of Dairy Science**, vol. 91, n. 3, p. 1198-1203,  
320 2008.
- 321 RACHAGANI, S.; GUPTA I. D. Bovine kappa-casein gene polymorphism and its  
322 association with milk production traits. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.  
323 893-897, 2008.
- 324 RODRIGUES, S. G. **Estudo das Frequências dos alelos A e B dos genes da**  
325 **kapacaseína e beta-lactoglobulina e suas associações com produção de leite em**  
326 **bovinos F1 girolando**. 2006. 30 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de  
327 Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 328 SAS INSTITUTE INC., **SAS 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc.**, 2002-2005.
- 329 SILVA, I. T.; DEL LAMA, M. A. Milk protein polymorphism in Brazilian Zebu cattle.  
330 **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 4, p.625 - 630, 1997.
- 331 TSIARAS, A.M.; BARGOULI, G.G.; BANOS, G; BOSCOS, C.M. Effect of kappa-  
332 casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive  
333 performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.327-334, 2005.

334 YEH, F.C.; Yang, R.C.; Boyle, T.B.J. **POPGEN (VERSION 1.32): Software**  
335 **Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis.** Alberta:  
336 University of Alberta. 1997.

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

### **CAPÍTULO III**

Estudo do polimorfismo e associação do gene *LGB* com a produção leiteira  
em bovinos Girolando<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

**1       Estudo do polimorfismo e associação do gene *LGB* com a produção leiteira em**  
**2   bovinos Girolando**

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

Resumo - Objetivou-se avaliar as frequências alélicas e genotípicas do gene da beta-lactoglobulina (*LGB*) e associá-las à produção de leite de bovinos participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando por meio de análise das variáveis de produção de leite em até 305 dias (P305) e de capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite. Para o estudo do polimorfismo, foram genotipados 131 touros e 737 vacas (n = 868) e para a análise de associação foram avaliados 127 touros e 536 vacas (n = 663). A diferenciação dos alelos A/B do gene estudado foi obtida por meio da técnica de PCR-RFLP. As frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram estabelecidos por meio do programa Popgen versão1.32 e testado pelo teste  $\chi^2$  ao nível de significância de 1%. O estudo de associação foi realizado por meio de análise de regressão utilizando o procedimento GLM do SAS 9.1. As frequências genotípicas e alélicas para o gene foram, respectivamente, 0,2604 (AA); 0,4827 (AB); 0,2569 (BB) e 0,5017 (A); 0,4983 (B). A população encontra-se em EHW. Não foi detectada associação entre o gene *LGB* e as variáveis analisadas.

Termos para indexação: equilíbrio, frequência, genótipo, leite

**25 Study of polymorphism and gene *LGB* association with milk production in**  
**26 cattle Girolando**

27

28 Abstract - This study aimed to evaluate the allele and genotype frequencies of the gene  
29 beta-lactoglobulin (*LGB*) and associate them with milk production of cattle participants  
30 Progeny Test Breed Girolando through variable analysis of milk production in 305 days  
31 (P305) and predicted transmitting ability (PTA) for milk. For the study of  
32 polymorphism were genotyped 131 bulls and 737 cows (n = 868) and for the association  
33 analysis were evaluated 127 bulls and 536 cows (n = 663). The differentiation of allele  
34 A / B gene studied was obtained by PCR-RFLP. Allele frequencies, genotype and  
35 calculating the probability of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were established  
36 through the program Popgen versão1.32 and tested by  $\chi^2$  test at a significance level of  
37 1%. The association study was performed by regression analysis using the GLM  
38 procedure of SAS 9.1. The allele and genotype frequencies for the gene were  
39 respectively 0.2604 (AA), 0.4827 (AB) 0.2569 (BB) and 0.5017 (A) 0.4983 (B). The  
40 population is in HWE. No association was found between the gene and the *LGB*  
41 variables.

42

43 Index terms: equilibrium frequency, genotype, milk

44

45

46

47

48

49

50

## INTRODUÇÃO

51

52 De acordo com Fox & McSweenwey (1998), a beta-lactoglobulina representa  
53 cerca de 50% da proteína do soro e 12% da proteína total no leite bovino. Ela é  
54 considerada, segundo Haraguchi et al. (2006), a maior proteína da fração solúvel  
55 encontrada no leite bovino apresentando peso molecular médio de 18400 Da.

56 Essa proteína foi utilizada durante muitos anos como modelo para estudos  
57 enzimáticos e estruturais a respeito da desnaturação e ligação entre íons e proteínas. Sua  
58 função biológica ainda não está estabelecida, mas deve estar envolvida no metabolismo  
59 e transporte de retinol e ácidos graxos (Formaggioni et al., 1999). Contudo, desde a  
60 descoberta dos alelos A e B da beta-lactoglobulina por Aschaffenburg & Drewry  
61 (1955), citado por Kontopidis et al. (2004), o polimorfismo genético dessa proteína tem  
62 sido foco de investigações, por sua relação com características composicionais e  
63 tecnológicas do leite (Oner & Elmaci, 2006).

64 Com isso, é grande o interesse no uso do gene *LGB* que codifica esta proteína  
65 como marcador, com o intuito de melhorar as características citadas acima, assim como  
66 a produção de leite e de derivados lácteos específicos.

67 Para o gene da beta-lactoglobulina (*LGB*), já foram identificadas em bovinos 12  
68 variantes genéticas (de A a J, W e Dr) (Formaggioni et al., 1999), sendo as variantes A e  
69 B predominantemente mais investigadas e caracterizadas até então (Haraguchi et al.,  
70 2006). Segundo Ng-Kwai-Hang et al. (2002), o genótipo BB da beta-lactoglobulina está  
71 associado às melhores propriedades de coagulação, como a firmeza e tempo de  
72 formação do coágulo, enquanto que o genótipo AA é associado à maior produção de  
73 leite.



74 O conhecimento a respeito das proporções dos diferentes genótipos e dos  
75 distintos alelos do gene na população por meio do estudo das frequências genotípicas e  
76 alélicas e a associação destas com os registros produtivos dos animais podem permitir o  
77 desenvolvimento de estratégias para a seleção assistida por marcadores, possibilitando o  
78 aumento da produção de leite e melhoria das características físico-químicas e  
79 tecnológicas, além de aumentar a rapidez e dinamismo na tomada de decisão quanto ao  
80 uso ou exclusão de um animal para reprodução.

81 Sendo assim, objetivou-se com o presente trabalho caracterizar as frequências  
82 alélicas e genotípicas do gene da beta-lactoglobulina (*LGB*) e associá-las à produção de  
83 leite em animais da raça Girolando.

84

85

## MATERIAL E MÉTODOS

86

87 Para a genotipagem, foram coletadas amostras de sêmen e sangue de 131 touros e  
88 sangue de 737 vacas filhas desses reprodutores, ambos participantes do Teste de  
89 Progênie da Raça Girolando coordenado pela Associação de Criadores da Raça  
90 Girolando (GIROLANDO) em parceria com a Embrapa Gado de Leite. O material  
91 biológico utilizado nesta pesquisa representa a totalidade de amostras disponíveis até  
92 março de 2012 para o gene em estudo no banco de DNA da raça na Embrapa. As  
93 amostras foram coletadas pelos técnicos da Associação quando das visitas para o  
94 controle leiteiro ou de classificação linear dos animais. Os animais são provenientes de  
95 fazendas de diferentes localidades do Brasil, todas colaboradoras do Teste de Progênie  
96 da raça.

97 O DNA genômico foi extraído das células do sangue e do sêmen utilizando-se o  
98 DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as

99 recomendações do fabricante. A quantificação e verificação da qualidade das amostras  
100 foram realizadas por espectrofotometria (Nanodrop<sup>®</sup>1000, Thermo Fisher Scientific  
101 Inc., Wilmington, USA).

102 As amostras de DNA extraídas foram submetidas à técnica de amplificação por  
103 PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores  
104 (*primers*) descritos por Medrano & Aguilar-Cordova (1990), e à técnica de PCR-RFLP  
105 para diferenciação das duas formas variantes, A e B (Tabela 1).

106

107 **Tabela 1.** Sequências dos *primers* utilizados no Teste de Progênie para  
108 amplificação do gene da beta-lactoglobulina (*LGB*)

Gene	Sequência (5' → 3')
<i>LGB</i>	F GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA R CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA

109

110 Cada reação de PCR possuía um volume final de 20 µl, contendo as concentrações  
111 de 1X de GoTaq<sup>®</sup>Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 125 nM de  
112 cada *primer* e 50 ng de DNA genômico. As temperaturas e os ciclos para a amplificação  
113 desse gene foram os seguintes: um período inicial de desnaturação a 94°C por 5  
114 minutos, 40 ciclos sendo desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento do *primer* a  
115 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao fim desta etapa, foi realizada  
116 uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Para amplificação utilizou-se o termociclador  
117 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA).

118 Para distinção das duas variantes do gene *LGB*, 10 µL do produto da reação de  
119 PCR foram digeridos com 4 U da enzima de restrição *Hae* III (New England Biolabs,  
120 Inc., Ipswich, EUA) em um volume final de 15 µl incubados a 37 °C, por 4 horas,

121 seguidos de um período de 20 minutos, a 80 °C, para inativação total da enzima. Os  
122 fragmentos formados foram observados em gel de agarose a 2,5% corado com brometo  
123 de etídio para detecção dos genótipos.

124 As frequências alélicas e genótípicas e o cálculo da probabilidade de Equilíbrio de  
125 Hardy-Weinberg (EHW) foram obtidos por meio do programa Popgen version 1.32  
126 (Yeh et al., 1997). A probabilidade de EHW associado às frequências genótípicas  
127 observadas foi testada pelo teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 1%.

128 O estudo de associação do gene *LGB* com a produção de leite foi realizado  
129 utilizando dados de produção de leite até 305 dias (P305) e a capacidade prevista de  
130 transmissão (PTA).

131 Foram utilizados dados fenotípicos de produção de leite de 536 vacas advindos do  
132 serviço de controle leiteiro da GIROLANDO e que compõem o Arquivo Zootécnico  
133 Nacional de Gado de Leite, gerenciado pela Embrapa Gado de Leite. As estimativas de  
134 PTA para a produção de leite, utilizadas para a análise dos 127 touros e 536 vacas  
135 avaliadas, são provenientes da avaliação genética realizada pela Embrapa Gado de  
136 Leite.

137 Para os dados de PTA, o seguinte modelo de substituição alélica foi utilizado:

138 
$$Y_{ij} = \mu + S_i + \beta x_{ij} + \epsilon_{ij},$$

139 no qual  $Y_{ij}$  é o valor relativo da PTA da filha  $j$  do touro  $i$ ;  $\mu$  é uma constante geral;  $S_i$  é o  
140 efeito fixo do touro  $i$ ;  $\beta$  é o coeficiente de regressão representando metade do efeito de  
141 substituição alélica ( $\alpha/2$ );  $x_{ij}$  é o número de alelos B (0,1 ou 2) no loco do gene *LGB* na  
142 filha  $j$  do touro  $i$  e  $\epsilon_{ij}$  é o efeito residual. As estimativas de PTAs foram ponderadas  
143 pelos valores das acurárias para obter estimativas de quadrados mínimos ponderados do  
144 efeito de substituição alélica.

145 Os dados de P305 foram analisados seguindo o seguinte modelo de efeitos fixos:

146 
$$Y_{ijklm} = \mu + S_j + GC_k + CG_l + O_m + \varepsilon_{ijklm},$$

147 em que,  $Y_{ijklm}$  representa os dados de produção de leite da vaca  $i$ , filha do touro  $j$ ;  $\mu$  é  
148 uma constante geral;  $S_j$  é o efeito fixo do  $j$ -ésimo touro;  $GC_k$  é o efeito fixo  $k$ -ésimo  
149 grupo contemporâneo (rebanho, ano de parto e estação de parto), sendo  $k = 1, 2, \dots, 52$ ;  
150  $CG_l$  é o efeito fixo da  $l$ -ésima composição genética ( $l = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ );  $O_m$  é o efeito do  
151  $m$ -ésimo genótipo ( $m = AA, AB, BB$ ) e  $\varepsilon_{ij}$  é o efeito residual.

152 O grupo de touros avaliados apresentou composição genética de 3/4 e 5/8 da raça  
153 Holandesa e o grupo de vacas apresentou a composição genética igual ou superior a 5/8  
154 da raça Holandesa.

155 O estudo de associação foi realizado por meio de análise de regressão utilizando o  
156 procedimento GLM do SAS 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary).

157

## 158 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

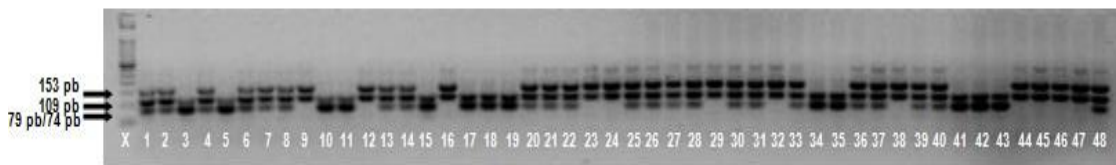
159

160 O produto da amplificação do gene *LGB* gerou uma banda de 262 pb, com dois  
161 alelos polimórficos representados por quatro fragmentos de 153, 109, 79 e 74 pb, a  
162 partir da digestão enzimática do produto da PCR. O genótipo AA identificado pela  
163 presença de dois fragmentos (- 153 e 109 pb), o AB é caracterizado pela presença dos  
164 quatro fragmentos e o BB apresenta três fragmentos (- 109, 79 e 74 pb) (Figura 1).

165

166

167



168

169 **Figura 1.** Perfil genotípico do gene *LGB* nos animais da raça Girolando. Gel de  
 170 agarose 2,5%: coluna X – marcador molecular de 100 pb; colunas 9, 12, 16, 23, 24, 29,  
 171 32, 38 e 44 a 47 – AA; colunas 1, 2, 4, 6 a 8, 13, 14, 20 a 22, 25 a 28, 30, 31, 33, 36, 37,  
 172 39, 40 e 48 – AB; coluna 3, 5, 10, 11, 15, 17 a 19, 34, 35 e 41 a 43 – BB

173 As frequências dos alelos A (0,5017) e B (0,4983) estão igualmente distribuídas  
 174 na população para o gene *LGB*. A população estudada encontra-se em Equilíbrio de  
 175 Hardy-Weinberg (EHW) para os alelos A e B do gene a 1% de probabilidade visto que  
 176 as frequências observadas e esperadas não diferem entre si (Tabela 2).

177

178 **Tabela 2.** Frequências alélicas e genotípicas do gene *LGB* na população da raça  
 179 Girolando

Genótipo	Número de Animais		Frequência		EHW
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
AA	226	218,3775	0,2604	0,5017 (A)	
AB	419	434,2450	0,4827		1,071034**
BB	223	215,3775	0,2569	0,4983 (B)	

180 \*\* P<0,01

181

182 Os valores das frequências alélicas encontrados discordam dos obtidos por Ng-  
 183 Kwai-Hang et al. (1984), que estudaram as frequências genotípicas e alélicas de 3.870

184 vacas da raça Holandesa, criadas em 63 rebanhos comerciais de Quebec, e não  
 185 encontraram os alelos igualmente distribuídos na população de animais em estudo, com  
 186 frequências alélicas de 0,3870 e 0,6130 para A e B, respectivamente, e genotípicas  
 187 0,1344 (AA), 0,5054 (AB) e 0,3602 (BB). A população estudada por esses autores  
 188 também se encontrava em EHW e a proporção de indivíduos heterozigotos foi superior  
 189 a de homozigotos, assim como verificado no presente estudo.

190 Por outro lado, Botaro (2007) obteve, utilizando 74 animais Girolando em seu  
 191 estudo, maior frequência do genótipo BB (0,4487) que os genótipos AB (0,3397) e AA  
 192 (0,2115), não encontrando equilíbrio na população.

193 A associação entre o gene *LGB* e as variáveis PTA e P305 não foi significativa  
 194 para os grupos avaliados de touros e vacas (Tabela 3). A estimativa do coeficiente de  
 195 regressão para o número de cópias para o alelo B (metade dos efeitos da substituição  
 196 alélica,  $\alpha/2$ ) indica que esse alelo não está relacionado com a produção de leite nas  
 197 vacas e touros analisados, sendo que houve uma tendência no decréscimo da PTA (-  
 198 18,39 kg). Para a P305, o número de cópias para o alelo B provocou decréscimo (-34,98  
 199 kg) na produção de leite, embora não significativo.

200

201 **Tabela 3.** Estimativas da substituição alélica ( $\alpha/2$ ) e *p-valor* associadas ao gene  
 202 *LGB* na população de vacas e touros da raça Girolando para a produção de leite

Variáveis	Substituição alélica ( $\alpha/2$ )	<i>p-valor</i>
P305 (kg)	- 34,98	0,7846 <sup>ns</sup>
PTA (kg)	- 18,39	0,4130 <sup>ns</sup>

203 <sup>ns</sup>Não-significativo

204

205 Os resultados encontrados nesta pesquisa se assemelham aos obtidos por Ng-  
206 Kwai-Hang et al. (1990), com animais da raça Holandesa, e Rodrigues (2006), com  
207 animais F1 Girolando, que também não encontraram efeito significativo para a  
208 associação do gene *LGB* com produção de leite.

209 No entanto, Aleandri et al. (1990) observaram que o genótipo AA determinou  
210 maior produção de leite, em vacas Holandesas de primeira lactação, assim como  
211 Bovenhuis et al. (1992) que observaram que vacas Holandesas de genótipo AA  
212 produziam 93 kg de leite a mais que vacas de genótipo BB. Em contrapartida, Jairam &  
213 Nair (1983) demonstraram produção de leite superior para vacas com genótipo BB.

214 Segundo Ng-Kwai-Hang et al (1990), os resultados conflitantes encontrados na  
215 literatura parecem estar relacionados a diferenças no tamanho das populações  
216 analisadas, diferença entre raças, e o mais importante, ao rigor da análise estatística no  
217 ajuste de fatores como idade, número de parto, estágio de lactação e efeitos de outras  
218 variáveis genéticas.

219 De acordo com Mello (2010), outro fator que deve ser levado em consideração é a  
220 composição genética da raça Girolando, que é um fator importante que pode afetar a  
221 produção leite, visto que é um grupo genético muito particular e que desses cruzamentos  
222 podem surgir interações peculiares para a produção de leite, ou ainda que o baixo  
223 número de animais amostrados pode não ter proporcionado a sensibilidade necessária  
224 para a correta avaliação de tal associação.

225

## 226 CONCLUSÕES

227

228 1. Com base nos dados analisados pode-se dizer que a população estudada  
229 encontra-se em EHW para o gene *LGB*.

230 2. O alelo B do gene *LGB* não está associado à produção de leite em até 305 dias  
231 nem à capacidade prevista de transmissão de leite nos animais da raça Girolando  
232 analisados neste estudo.

233

## 234 AGRADECIMENTOS

235

236 Ao Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa  
237 Gado de Leite e Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, pela concessão dos  
238 dados para realização desta pesquisa.

239

## 240 REFERÊNCIAS

241

242 ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L. G.; SCHNEIDER, J. C. The effects of milk  
243 polymorphism on milk components and cheese-producing ability. **Journal of Dairy**  
244 **Science**, v.73, p. 241-255, 1990.

245 BOTARO, B. G. **Variantes genéticas de beta-lactoglobulina em vacas leiteiras e**  
246 **características físico-químicas e de composição do leite**. 2007. 74 f. Dissertação  
247 (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e  
248 Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

249 BOVENHUIS H.; JOHAN, A. M; ARENDONK, V.; KORVER, S. Association  
250 between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy**  
251 **Science**, v.75, p. 2549-2559, 1992.

252 FORMAGGIONI, P.; SUMMER, A.; MALACARNE, M.; MARIANI, P. [1999]. **Milk**  
253 **protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in Bos**



- 254 **genus**. Univerità degli Studi di Parma. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria,  
255 1999. v. 19, p. 127-165. Disponível em:  
256 <<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>> Acesso  
257 em: 22 Mar. 2012.
- 258 FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London:  
259 Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.
- 260 HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite:  
261 composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde  
262 humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- 263 JAIRAM, B. T.; NAIR, P. G. Genetic polymorphisms of milk proteins and economic  
264 characters in dairy animals. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 53, p. 1, 1983.
- 265 KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: betalactoglobulin: binding  
266 properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.785-796, 2004.
- 267 MEDRANO J.F.; AGUILAR-CORDOVA, E. Genotyping of bovine kappa-casein loci  
268 following DNA sequence amplification. **Biotechnology**, v. 8, p.144-146. 1990.
- 269 MELLO, F. **Diversidade genética e associação do gene da osteopontina com a**  
270 **produção de leite em bovinos da raça Girolando**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado  
271 em Produção Animal) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande  
272 do Sul, Porto Alegre.
- 273 NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES, H.G.; HAYES, J.F. Association between  
274 genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations.  
275 **Journal of Dairy Science**, v. 73, p.3414-3420, 1990.

- 276 NG-KWAI-HANG, K.F.; OTTER, D.E.; LOWE, E.; BOLAND, M. J.; AULDIST, M. J.  
277 Influence of genetic variants of beta-lactoglobulin on milk composition and size of  
278 casein micelles. **Milchwissenschaft**, v.57, n.6, p.303-306, 2002.
- 279 NG-KWAIN-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E. Association of genetic  
280 variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by  
281 dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.835-840, 1984.
- 282 ONER, Y.; ELMACI, C. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. **International**  
283 **Journal of Dairy Technology**, v.59, p.180-182, 2006.