

SANDRA GUIMARÃES RODRIGUES

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.

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Área: Genética e Melhoramento Animal. Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira.

BELO HORIZONTE
UFMG – ESCOLA DE VETERINÁRIA
2006

**Dedico este trabalho aos meus pais
pelo apoio, incentivo e carinho.**

Agradecimentos

À professora Denise A. Andrade de Oliveira pela confiança, incentivo e todas oportunidades dadas.

À querida amiga, Dra. Ana Paula Madureira, pelo carinho, paciência, sugestões e fundamental ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos grandes amigos do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG: Eduardo, Cláudia, Lilian, Daniel, Arno, Daniela, Angelo, Henrique, Ronaldo, pelo auxílio, amizade e momentos de descontração.

Aos professores, Jonas Pereira, Sandra Gesteira, Angela Lana, Décio, Martinho e Ronaldo pela ajuda na elaboração deste trabalho.

À EPAMIG pela colaboração na obtenção das amostras analisadas.

Ao amigo Paulo Afonso pela ajuda na colheita das amostras.

Ao Colegiado de Pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG, pelo maior prazo concedido.

Ao Juba, que chegou no finalzinho, pelo apoio, carinho, amizade, e por sempre compreender meus momentos de ausência.

Aos novos amigos que adquiri durante todo o período do curso: Bel, Joana, “Kengas”, Luciano, Ricardo, Daniel, Paulo, Edgard, Aníbal, Jair e outros, pela descontração, bate-papo e alegria nos momentos de relaxamento.

Aos “velhos”, inesquecíveis e estimados amigos - irmãos: Eloá, Magda, Agueda, Carlinha, Regina, Eugênio, Tchuries, Rochinha, Thiaguinho, Marcão, Chico, Helen, Vanina, e tantos outros, que souberam compreender minhas angústias e ausências.

Ao Danilo, da UPD, pelo auxílio na montagem das planilhas para as análises estatísticas.

Às Prof^{as} do ICB, Maria Raquel e Cleusa, que foram de grande ajuda na parte prática de meu projeto.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

SUMARIO

RESUMO	7
ABSTRACT	7
1- INTRODUÇÃO GERAL	8
2- Capítulo 1 – ASSOCIAÇÃO DO GENE DA KAPA-CASEÍNA COM PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS F₁ GIROLANDO	9
Resumo	9
Abstract	9
2.1 - Revisão bibliográfica	9
2.2 - Material e Métodos	12
2.2.1 - Composição da amostra	12
2.2.2 - Extração de DNA	12
2.2.3 - Análise do marcador κ -Cn por meio da Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	12
2.2.3.1 - <i>Primers</i>	13
2.2.3.2 - A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) – protocolo e programa	13
2.2.3.3 - Digestão com enzima de restrição	13
2.2.3.4 - Coloração dos géis	14
2.2.4 - Análise dos dados	14
2.3 - Resultados e discussão	15
2.4 - Conclusões	16
2.5 - Referências bibliográficas	17
3 - Capítulo 2 – ASSOCIAÇÃO DO GENE DA BETA-LACTOGLOBULINA COM PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS F₁ GIROLANDO	19
Resumo	19
Abstract	19
3.1 - Revisão bibliográfica	19
3.2 - Material e Métodos	21
3.2.1 - Composição da amostra	21
3.2.2 - Extração de DNA	21
3.2.3 - Análise do marcador β -Lg por meio da Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	21
3.2.3.1 - <i>Primers</i>	21
3.2.3.2 - A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) – protocolo e programa	22
3.2.3.3 - Digestão com enzima de restrição	22
3.2.3.4 - Coloração dos géis	23
3.2.4 - Análise dos dados	23
3.3 - Resultados e discussão	23
3.4 - Conclusões	25
3.5 - Referências bibliográficas	26
4 - CONCLUSÕES GERAIS	28
5 - ANEXOS	29
Anexo 1 - ANOVA para o gene da κ -Cn, nas quatro lactações separadamente e juntas, relacionando genótipos, ano de nascimento da vaca e produção aos 305d, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006	29
Anexo 2 - ANOVA para o gene da β -Lg, nas quatro lactações separadamente e juntas, relacionando genótipos, ano de nascimento da vaca e produção aos 305d, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006	29

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	
Tabela 1 - Protocolo mix de amplificação para o gene κ -Cn (vol. 25 μ l), em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	13
Tabela 2 - Programa de PCR (25 ciclos), em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	13
Tabela 3 - Protocolo mix PCR para Taq I e Hind III (Vol. final 10 μ l), em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	14
Tabela 4 - Frequência dos alelos do gene da κ -Cn, em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	15
Tabela 5 - Frequência dos genótipos do gene da κ -Cn, em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	15
Tabela 6 - Tabela de contingência para o gene da κ -Cn entre genótipos e categorias de produção nas quatro lactações, em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	16
Capítulo 2	
Tabela 1 - Protocolo mix de amplificação para o gene β -Lg (vol. 25 μ l), em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	22
Tabela 2 - Programa de PCR (25 ciclos), em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	22
Tabela 3 - Protocolo mix PCR para Hae III (Vol. final 20 μ l), em ensaio realizado no Lab. de da EV/UFMG em 2006	22
Tabela 4 - Frequência dos alelos do gene da β -Lg, em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	24
Tabela 5 - Frequência dos genótipos do gene da β -Lg, em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	24
Tabela 6 - Tabela de contingência para o gene da β -Lg entre genótipos e categorias de produção nas quatro lactações, em ensaio realizado no Lab. de Genét. da EV/UFMG em 2006	25

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1	
Quadro 1 - Relação das frequências genotípicas e gênicas do gene da κ -Cn citadas em alguns trabalhos de pesquisa	10
Capítulo 2	
Quadro 1 - Relação das frequências genotípicas e gênicas do gene da β -Lg citadas em alguns trabalhos de pesquisa	20

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	
Figura 1 - Catálogo de touros da raça Holandesa	12
Figura 2 - catálogo de touros da raça Jersey	12
Figura 3 - Gel de poliacrilamida a 8% mostrando os fragmentos do gene da κ -Cn digeridos com a enzima de restrição Hind III, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG, em 2006	15
Capítulo 2	
Figura 1 - Gel de poliacrilamida a 8% mostrando os fragmentos do gene da β -Lg digeridos com a enzima de restrição Hae III, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG, em 2006	24

RESUMO

A seleção artificial, baseada na escolha de animais com fenótipos superiores, é tradicionalmente utilizada em programas de melhoramento genético animal. A seleção de bovinos leiteiros tem sido baseada exclusivamente em características quantitativas, como produção de leite, as quais são controladas por múltiplos pares de genes. Portanto a seleção torna-se lenta, além de ser influenciada por fatores ambientais. Características qualitativas, como tipos de proteínas, começam a ser investigadas com o objetivo de melhorar a precisão da estimativa do mérito genético dos animais. A seleção de indivíduos que possuem genes favoráveis para características de interesse, baseada na avaliação direta de seu DNA é denominada Seleção Assistida por Marcadores (MAS - Marker Assisted Selection). Neste tipo de seleção tem-se a vantagem de poder genotipar os animais de ambos os sexos e logo após o nascimento. A fração proteica do leite está constituída por numerosas proteínas específicas, sendo as caseínas e proteínas do soro as mais importantes, onde a Kapa-caseína (κ -Cn) e a Beta-lactoglobulina (β -Lg) são as mais representativas, respectivamente. Neste trabalho, genotipou-se 70 animais F₁ Girolando, de rebanho leiteiro do município de Felixlândia em Minas Gerais, com o objetivo de associar estes marcadores com produção de leite, bem como estabelecer suas frequências genotípicas e gênicas. Os resultados encontrados mostraram 80% dos animais com genótipo AA e 20% AB, e frequências gênicas de 90% para o alelo A e 10% para o B para a κ -Cn; e 7,14% para o genótipo AA, 57,14% para AB e 35,71% para BB e 64% para o alelo A e 36% para o B para o gene da β -Lg. Não foi observada associação entre estes dois marcadores e produção de leite para este rebanho.

Palavras - chave: bovinos, produção de leite, DNA, polimorfismo genético, Kapa-caseína, Beta-lactoglobulina.

ABSTRACT

Based on choosing animals with superior phenotypes, artificial selection is traditionally used in animal breeding programs. The selection of milk cows has been exclusively based on quantitative characteristics such as milk production, which is controlled by various pairs of genes making selection a slow process. Production is also subject to the influence of ambient factors. To improve the accuracy of estimates of the animal's breeding value, qualitative characteristics, such as protein types, have been investigated. The selection of individuals with genes favorable to the desired characteristics, based on their direct DNA evaluation, is called marker assisted selection (MAS). This kind of selection has the advantage that it is able to genotype the animals right after birth and for both sexes. The protein fraction of milk is comprised by various specific proteins. The most important ones are the caseins and sour protein. Some studies have associated the Kappa-casein (κ -Cn) and the Beta-lactoglobulin (β -Lg) genes with milk production and quality. The results obtained are mixed, which could be related to genetic differences between and within breeds, the number of analyzed samples and the difficulties with statistical analyses. The objective of this study was to associate these markers with milk production and to establish their frequencies. Seventy F₁ Girolando animals from a milk herd located in the town of Felixlândia in Minas Gerais state were genotyped, with the objective of associating these markers with milk production and establishing their genotypic and genic frequencies. The results showed that 80% of the animals had AA genotype and 20% AB for κ -Cn. The gene frequency was of 90% of A and 10% of B. The BB genotype did not appear in these samples. For β -Lg the genotypic frequencies were 7,14% AA, 57,14% AB and 35,71% BB, and the gene frequencies were 64% for the allele A and 36% for the allele B. There was no trace of association between these two markers and the milk production for this herd.

Keywords: bovine, milk yield, DNA, genetic polymorphism, Kappa-casein, Beta-lactoglobulin.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde 1960, geneticistas e criadores têm dado importância ao uso de marcadores genéticos, principalmente para a identificação de paternidade e como auxiliares na seleção. Com o aprimoramento das técnicas de biologia molecular ocorreu a possibilidade de decifrar o código genético humano, animal e de plantas, e localizar pontos de referência nos seus cromossomos, denominados marcadores genéticos, alguns dos quais estão presentes em regiões de regulação de importantes funções biológicas. Esta tecnologia tem aberto perspectivas de aumentar a precisão e a compreensão da avaliação genética, por localizar genes e regiões genômicas que podem ser exploradas em programas de melhoramento genético animal.

A seleção artificial tradicionalmente utilizada em programas de melhoramento animal é baseada na escolha de animais que expressem fenótipos superiores, ou em avaliações genéticas que predizem o mérito genético de determinada característica de interesse. A seleção de bovinos leiteiros tem sido baseada exclusivamente em características quantitativas, como, por exemplo, rendimento de leite, produção de carne, ganho de peso, teste de gordura; os quais são controlados por múltiplos pares de genes. O melhoramento genético de características quantitativas é relativamente lento porque essas são controladas por numerosos genes, e altamente influenciadas por fatores ambientais. Características qualitativas, como grupos sanguíneos, enzimas, proteínas do soro sanguíneo e tipos de proteínas do leite, estão entre aquelas que começam a ser investigadas com a intenção de melhorar a precisão da estimativa do mérito genético dos animais.

A seleção de indivíduos que possuem genes favoráveis para as características de interesse, baseada na avaliação direta do DNA, é denominada Seleção Assistida por Marcador (MAS - Marker Assisted Selection). Esse tipo de seleção já é utilizada em características de produção de carne ou leite, e na identificação de indivíduos portadores de doenças genéticas como BLAD e DUMPS, entre outras. Sua grande vantagem está em poder diminuir intervalos de gerações, reduzir custos com a manutenção da progênie, já que a identificação

pode ser feita logo após o nascimento, em animais de ambos os sexos, e aqueles com alto potencial genético podem ser mantidos no programa, enquanto que os de baixo potencial podem ser descartados. O uso de características qualitativas, monogênicas, como tipo de proteínas do leite, pode ser excelente ferramenta como marcador auxiliar de seleção em programas de melhoramento, resultando no aumento da produção de leite, na alteração da composição e melhoria de sua qualidade.

A fração protéica do leite é constituída por numerosas proteínas específicas, sendo as caseínas (α_s , γ , β e κ) e as proteínas do soro α -lactalbumina e β -lactoglobulina as mais importantes, representando de 90 a 95% de proteínas do leite. As três possíveis origens dessas proteínas, sintetizadas na mama, são os peptídeos, as proteínas do plasma e, principalmente os aminoácidos livres. Estas variantes possuem diferentes composições químicas e se identificam por sua mobilidade eletroforética, refletindo a ação de genes autossômicos transmitidos dos pais para a prole por herança mendeliana simples.

Em muitos países estrangeiros os estudos nesta área estão bem avançados em algumas raças de *Bos taurus*, principalmente a Holandesa. Já em zebuínos, ainda há muito a ser estudado, e a maioria das pesquisas são desenvolvidas na Austrália e Estados Unidos, entretanto tais pesquisas são direcionadas às raças de corte, com destaque para a raça Brahman. Existem alguns laboratórios no Brasil que prestam serviços de genotipagem para marcadores moleculares em bovinos de leite e corte. No entanto, esses marcadores foram desenvolvidos para raças taurinas, não estando devidamente validados para as raças zebuínas e suas cruzas.

Este trabalho teve como objetivo identificar, os alelos da Beta-lactoglobulina (β -Lg) e da Kappa-caseína (κ -Cn) e associá-los com produção de leite em bovinos F₁ Girolando, visto serem estes animais intensamente utilizados em nossos rebanhos leiteiros, onde a produção de leite nacional é de 60% (15 bilhões de litros); podendo assim, fornecer subsídios importantes a programas de seleção para produção leiteira.

2. Capítulo 1 - ASSOCIAÇÃO DO GENE DA κ -CN COM PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS F₁ GIROLANDO

Resumo

Foram utilizados 70 animais F₁ Girolando, provenientes de uma única fazenda no Município de Felixlândia em Minas Gerais. O presente estudo teve como objetivo associar o gene da κ -Cn com produção de leite, bem como determinar suas frequências genotípicas e gênicas. Os resultados mostraram frequências genotípicas de 80% para AA e 20% para AB. O genótipo BB não ocorreu nas amostras analisadas neste trabalho, sendo as frequências gênicas de 90% para o alelo A e 10% para B. Não houve significância para a associação entre genótipo e produção de leite.

Abstract

In this study 70 F₁ Girolando animals were used, coming from one single farm of one town in Minas Gerais, with the objective of associating the κ -Cn gene with milk production, as well as determining their genotypic and genetic frequencies. The results showed, in agreement with the literature concerning the frequencies, 80% AA and 20% AB. The BB genotype did not appear within these samples, and frequencies for A were 90%, with 10% for B. There was no significance towards association.

2.1. Revisão Bibliográfica

Desde o descobrimento de polimorfismos genéticos no gene da β -Lg por Aschaffenburg e Drewry (1955), variantes genéticas têm sido encontradas em todas as maiores proteínas do leite. Diversos polimorfismos têm sido descritos para o gene da κ -Cn, tanto na região

codificadora quanto na promotora. Algumas dessas variantes genéticas foram relacionadas a diferenças de produção e qualidade do leite.

A κ -Cn bovina, cuja estrutura primária foi determinada por Mercier *et al* (1973), apresenta 169 resíduos de aminoácidos, é polimórfica em todas as raças, com duas variantes mais comuns, κ -Cn A e κ -Cn B. Recentemente, foram descobertos os alelos C e E, mais raros, em muitas raças (Erhardt & Senft, 1989). A diferença na mobilidade eletroforética dessas duas variantes resulta da substituição do aminoácido 148 Asp - Ácido Aspártico (κ -Cn A) para Ala - Alanina (κ -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 códons (Rogne *et al*, 1989). Os dois alelos podem ser detectados por análise de DNA pela técnica de RFLP (Polimorfismo de Fragmento de Restrição), utilizando as enzimas de restrição Hind III e Taq I.

El-Negourmy (1971 e 1974) observou que a estabilidade das micelas de caseína em diferentes soluções é fortemente influenciada pelas combinações de suas variantes. A diferença em rendimento de queijo se deve, principalmente, à baixa perda de gordura no soro de leite para a variante B. Alguns estudos demonstraram que o alelo B está relacionado com melhor qualidade do leite para manufatura de queijo e produção de leite. No entanto, os resultados de associação entre alelo e produção de leite são conflitantes. Alguns trabalhos demonstram que o alelo A seria o mais favorável.

No quadro 1 pode-se observar as frequências gênicas e genotípicas do gene da κ -Cn, descritas em vários estudos feitos com as raças zebuínas e taurinas.

Quadro 1 - Relação das frequências genotípicas e gênicas do gene da κ-Cn, citadas em alguns trabalhos de pesquisa

Raça	Freq. Genotípicas			N	Freq. Gênicas		Referência
	AA	AB	BB		A	B	
<i>Holandês</i>	62,71	32,92	24,56	31	79,17	41,02	Marziali & Ng-Kwai_Hang, 1986
<i>Holandês</i>	62,92	33,80	3,27	3111	79,82	20,17	Gonyon <i>et al</i> , 1987
<i>Holandês</i> Ayrshire <i>Holandês</i> x Ayrshire	40,32 26,28 34,35	56,98 65,38 61,49	2,7 8,3 4,2	372 156 361	68,81 41,03 65,09	31,19 58,97 34,95	Lin <i>et al</i> , 1989
<i>Holandês</i> fêm.* <i>Holandês</i> mac.**	58,62 73,81	39,66 26,19	1,7 0	58 42	78,45 86,90	21,55 13,09	Zadworny & Kuhnlein, 1990
<i>Holandês</i>	54,56	40,94	4,5	2005	75,03	24,97	Aleandri <i>et al</i> , 1990
<i>Holandês</i>	54,54	41,54	3,92	6509	75,31	24,69	Ng-Kwai-Hang <i>et al</i> , 1990
<i>Holandês</i>	60,09	37,22	2,69	1714	73,47	26,53	Ng-Kwai-Hang <i>et al</i> , 1991
<i>Holandês</i>	68,63	23,53	7,8	51	80	20	Pinder <i>et al</i> , 1991
<i>Holandês</i>	-	-	-	230	63	37	Rahali & Ménard, 1991
<i>Holandês</i> Jersey Pardo Suíço Guernsey Shorthorn	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1152 172 50 40 40	82 14 33 73 89	18 86 67 27 11	Eenennaam & Medrano, 1991
<i>Holandês</i>	63,63	32,62	3,75	10151	79,94	20,06	Bovenhuis <i>et al</i> , 1992
<i>Holandês</i> Ayrshire Jersey	75 58 0	23 39 15	2 3 85	641 132 20	86 78 8	14 22 92	Sabour <i>et al</i> , 1993
<i>Holandês</i>	78,57	20,54	0,9	112	89	11	Ron <i>et al</i> , 1994
<i>Holandês</i>	74	23	3	566	85,5	14,5	Sabour <i>et al</i> , 1996
<i>Holandês</i> Gir fêm. Sel.*** Gir fêm. ñ. sel.**** Gir mac.	62,50 100 93,33 76,92	33,30 0 3,33 23,08	4,16 0 3,33 0	24 30 30 26	79 100 95 88	21 0 5 12	Valente, 1996
Guzerá Nelore Caracu <i>Holandês</i> Gir	96 84 45 66 87	4 16 52 29 13	0 0 2 5 0	72 - - - -	98 92 71 80,5 93,5	2 8 28 19,5 6,5	Castelhano <i>et al</i> , 1996
Gir Guzerá Nelore Sindi	- - - -	- - - -	- - - -	283 205 17 22	94,5 80,2 97,1 65,9	5,5 19,8 2,9 34,1	Silva & Del Lama, 1997
Gir Guzerá Nelore	- - -	- - -	- - -	20 25 63	93 92 91	7 8 9	Kemenes <i>et al</i> , 1999
Nelore	86,59	12,19	1,22	82	92	8	Faria <i>et al</i> , 1999
Hereford Limousine <i>Holandês</i> x Limousine <i>Holandês</i>	59,32 20 38,64 34,40	27,12 30 50 40,80	13,56 50 11,36 24,80	59 10 88 125	72,9 35 64,2 54,8	27,1 65 35,8 45,2	Litwinczuk & Król, 2002

*fêmea; ** macho; *** fêmea selecionada para leite; **** fêmea não selecionada para leite.

Neste quadro podemos observar a prevalência do alelo A nas raças Holandesa e Gir, e o contrário, ou seja, a prevalência do alelo B nas raças Jersey, Pardo Suíço e Limousine.

Observa-se também a maior frequência do genótipo AB na raça Holandesa (Lin *et al*, 1989; Litwinczuk & Król, 2002) bem como nas raças Caracu, Ayrshire, Limousine (Lin *et al*, 1989; Castelhana *et al*, 1996; Litwinczuk & Król, 2002), e não do genótipo AA, o que ocorre na maioria dos trabalhos.

Muitos trabalhos foram descritos para esse gene em várias raças, tanto zebuínas quanto taurinas, sendo demonstrado que o alelo A prevalece em zebuínos, como por exemplo na raça Gir, e em taurinos, como na Holandesa. O contrário ocorre em animais taurinos, como os da raça Jersey. Embora o alelo B da κ -Cn tenha sido associado com aumento na porcentagem de proteína do leite e rendimento, efeitos não significativos foram observados por Cowan *et al* (1992). Em outro estudo, Lin *et al* (1989), verificaram que vacas com genótipo BB produzem mais do que as de genótipo AA e AB, em animais das raças Holandesa, Ayrshire e seu cruzamento. Em contraste, Gonyon *et al* (1987), observaram efeito significativo oposto: vacas Holandesas AA apresentaram, em média 180Kg a mais de leite do que vacas BB. Bovenhuis *et al* (1992) demonstraram que vacas com genótipo BB produzem 173Kg menos de leite do que vacas com genótipo AA. Ainda, outros pesquisadores, como Aleandri *et al* (1990); McLean *et al* (1987) e McLean *et al* (1984), relataram que não há efeito de cada alelo na produção de leite.

A frequência do alelo B nos zebuínos criados no Brasil varia de 2 a 10% sendo, portanto, inferior às frequências obtidas nas raças indianas (16 a 21%). Apesar de serem raças distintas, pode-se supor que essa diferença seja função do efeito fundador, visto ter sido o rebanho zebuíno nacional formado por poucos animais. Outro fator que poderia explicar tal frequência é o efeito da seleção, pois os criadores, ao selecionarem algumas características quantitativas, estariam indiretamente escolhendo animais homocigotos para o alelo A

ou utilizando os heterocigotos em pequenas proporções (Faria *et al*, 1999).

De acordo com Ng-Kwai-Hang *et al* (1990), os resultados obtidos em vários estudos podem ser conflitantes e não comparáveis devido a diferenças no tamanho das populações analisadas, diferença entre raças, frequência da ocorrência de variantes genéticas específicas, metodologia de expressão das características, e o mais importante, no rigor da análise estatística no ajuste de fatores como idade, número de parto, estágio de lactação, e efeitos de outras variáveis genéticas.

Como todas caseínas estão localizadas na região do cromossomo 6, entre 200 e 300Kb, no braço q31 a 33, o potencial para efeito de desequilíbrio de ligação é grande, pela proximidade dos genes. O efeito dentro de uma família pode alterar por diferenças entre locos de caseínas e outros genes de proteínas, e poderia explicar as inconsistências observadas em estudos anteriores (Cowan *et al*, 1992; Braunschweig *et al*, 2000), também devido aos efeitos de ligação gênica, visto que vários autores demonstraram forte ligação entre κ -Cn e β -Cn (Bovenhuis *et al*, 1992; Ikonen *et al*, 1999).

A Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora (MG), em trabalho recente, apresentou aos produtores o uso de marcadores moleculares associados a características de interesse econômico, como a κ -Cn, em zebuínos leiteiros. Este dado teve divulgação no sumário da raça Gir leiteira, no ano de 2006. Dos 140 touros testados, 12 apresentaram a variante B que está relacionada com maior produção de queijo. Para o ano de 2007, espera-se incluir este dado no sumário de reprodutores da raça Guzerá. O genótipo para a κ -Cn já está presente em vários catálogos de touros, conforme pode ser observado nas figuras 1 e 2.

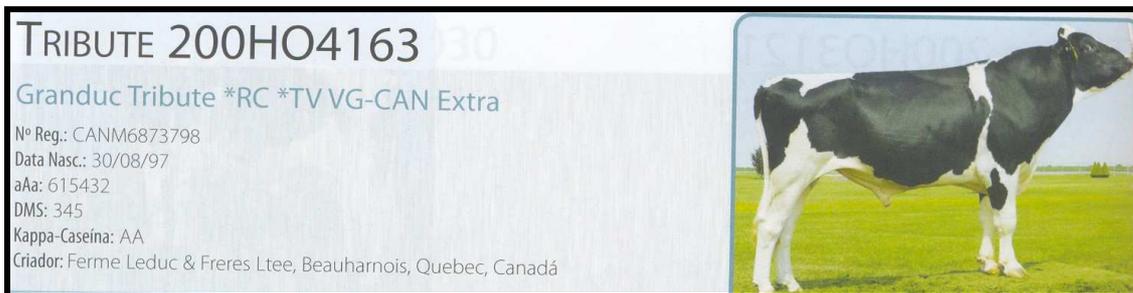


Figura 1 – Catálogo de touros da raça Holandesa. Fonte: SEMEX, 2005

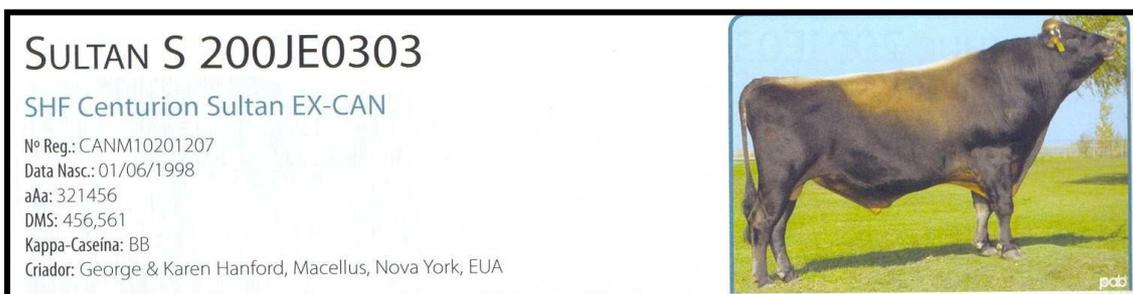


Figura 2 - Catálogo de touros da raça Jersey. Fonte: SEMEX, 2005

O objetivo deste estudo foi associar o gene da κ -Cn com a produção de leite e também determinar as frequências gênicas e genotípicas neste rebanho F₁ Girolando.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Composição da Amostra

Foram analisadas amostras de sangue e/ou pêlo de 70 animais F₁ Girolando, constituídos por fêmeas entre primeira e quarta lactação, provenientes de fazenda localizada no Município de Felixlândia no Estado de Minas Gerais.

2.2.2. Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue foi extraído segundo o protocolo descrito por Lewin e Stewart-Haynes (1992), e as de pêlo segundo técnica do Veterinary Genetics Laboratory - UC Davis - USA. (não publicado). Realizadas no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG.

2.2.3. Análise do marcador κ -Cn por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para estudo do loco que codifica a κ -Cn, foram feitas ampliações pela PCR com *primers* específicos e digestão com as enzimas de restrição Taq I e Hind III. Sendo que a Taq I foi utilizada para confirmar a genotipagem, quando necessário.

2.2.3.1 – Primers

O desenho dos primers utilizados foram descritos por Zadworny & Kunhlein (1990).

Primer 1

5' - GCTAGTGGTGACCCTACAAGT - 3'

Primer 2

5' - CTCAGGTGGGCTCTCAATAAC - 3'

2.2.3.2 – A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – protocolo e programa

O protocolo para amplificação e programação do termociclo para identificação do gene da κ -Cn, empregado neste trabalho encontra-se descrito nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Protocolo mix de amplificação para o gene da κ -Cn (vol. final 25 μ l), em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

REAGENTES	VOLUME (μ l)
H ₂ O Milli-Q	12
Tampão especial 5x (Phoneutria)	5
DNTP (10 mM)	1
Primers (10 pmol/ μ l)	1,5 (0,75 μ l cada)
Taq polimerase (5u/ μ l)	0,2
DNA (100 ng/ μ l)	5,0

Tabela 2 - Programa de PCR (25 ciclos), em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Passo 1	4 min.	94° C
Passo 2	1 min.	94° C
Passo 3	1 min.	60° C
Passo 4	1 min.	72° C
Passo 5		+24 ciclos (passos 2 a 4)
Passo 6	5 min.	72° C
Passo 7	2 horas	4° C

2.2.3.3 – Digestão com enzima de restrição

O protocolo para digestão com as enzimas de restrição Hind III e Taq I, encontra-se descrito na tabela 3.

Os produtos de DNA obtidos pela PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição Hind III que gera fragmentos de 99

pares de base (pb) para o genótipo AA; 99, 65 e 34 pb para o AB e 65 e 34 pb para o BB. A enzima Taq I foi utilizada para confirmar a genotipagem, quando necessário, apresentando um fragmento de 99 pares de base (pb) para se detectar o genótipo AA, três fragmentos de 99, 67, 32 pb para se detectar o genótipo AB e dois fragmentos de 67 e 32 pb para se detectar o genótipo BB.

Tabela 3 - Protocolo para digestão com Taq I e Hind III (Vol. final 10µl), em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

REAGENTES	VOLUME (µl)
H ₂ O Milli-Q	3,86
Tampão (REact 10x Invitrogen)	1
Enzima (Invitrogen)	0,13
Produto mix PCR	5

O tempo e temperatura de corte, no termociclo, das enzimas de restrição foram de 2 horas a 37°C para Hind III e 3 horas a 65°C para Taq I.

Os produtos da digestão da enzima de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% a 100V por 2 horas. Colocando-se sempre uma amostra não digerida e outra de genótipo conhecido AB, como controle do corte da enzima, e uma amostra sem DNA, para controle de contaminação do mix de PCR.

2.2.3.4 – Coloração dos géis

A visualização das bandas foi feita pela coloração do gel utilizando o método do Nitrato de Prata. Após a coloração o gel foi analisado em transiluminador de luz branca e fotografado com câmera digital.

2.2.4. Análise de dados

Para verificar a associação entre marcador e produção de leite utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2), mediante tabela de contingência, e também análise de variância (ANOVA) com emprego do pacote estatístico SAS (SAS, 1994). Segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + AN_i + GEN_j + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} é a produção ajustada aos 305 dias

μ é a média da população

AN_i é o efeito fixo de ano de nascimento (1995 a 2000)

GEN_j é o efeito fixo de genótipo do gene da κ -Cn (AA e AB)

e_{ijk} é o erro aleatório

As frequências gênicas e genótípicas foram obtidas por meio do programa Popgene versão 1.31 (Yeh & Boyle, 1997).

Foram feitos ajustes para 305 dias de produção nas quatro lactações estudadas, por meio de média, onde empregou-se a fórmula $P_{305} = \Sigma (PD \times DI) + (UP \times D_{305})$, onde:

PD é a produção no dia do controle

D são os dias desde a última pesagem

UP é a última produção pesada

D_{305} são os dias faltantes para chegar aos 305 dias de produção

Os valores de produções ajustados foram dispostos em categorias (1 - alta, 2 - média e 3 - baixa). Para tal, utilizou-se curva de distribuição obtida pelo programa estatístico BioEstat 2.0 (Ayres *et al*, 2000). A tabela de contingência foi elaborada com as três categorias e os genótipos relacionados a cada uma delas.

2.3. Resultados e Discussão

Dos 70 animais F₁ Girolando analisados, 80% tinham o genótipo AA e 20% apresentaram o genótipo AB. Não foi possível observar nenhum animal com o genótipo BB. A população estudada encontra-se dentro dos princípios de equilíbrio de Hard-Weinberg. Os genótipos encontrados neste trabalho podem ser visualizados na figura 3.

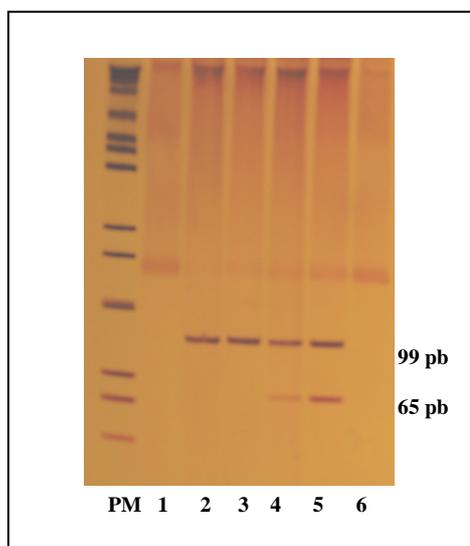


Figura 3 – Gel de poliacrilamida a 8% mostrando os fragmentos do gene da κ -Cn digeridos com a enzima de restrição Hind III, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006
PM: padrão de peso molecular
Canaletas 1 e 6: produtos não amplificados
Canaletas 2 e 3: genótipo AA
Canaletas 4 e 5: genótipo AB

As freqüências gênicas e genotípicas para o loco da κ -Cn, encontradas neste estudo, estão descritas nas tabelas 4 e 5. Onde se observa que parece estar ocorrendo uma fixação do alelo A e, conseqüentemente, do genótipo AA nesta população. Corroborando com outros trabalhos que mostram tendência à fixação do alelo A e maior freqüência do genótipo AA, para as raças

zebuínas, como o Gir (Valente, 1996; Castelhana *et al*, 1996; Silva e Del Lama, 1997; Kemenes *et al*, 1999) e taurinas, como o Holandês (Ng-Kwai-Hang *et al*, 1984; Lin *et al*, 1986; Rahali e Ménard, 1991, Eennennaam e Medrano, 1991; Sabour *et al*, 1993).

Tabela 4 - Freqüência dos alelos do gene da κ -Cn, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Alelos	Freqüência (%)
A	90
B	10

Tabela 5 - Freqüência dos genótipos do gene da κ -Cn, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Genótipos	Freqüência (%)
AA	80
AB	20

Os animais das raças Gir e Holandês possivelmente estão sendo selecionados, indiretamente para outras características de interesse, como a conformação na raça Gir, e conseqüentemente, de modo indireto isso pode estar aumentando a freqüência do alelo A na população. Outra explicação para a alta freqüência do alelo A, pode ser dada pelo efeito fundador, devido ao fato da utilização de poucos touros nos rebanhos da raça Gir. Por isso a importância de estabelecer a freqüência do gene em várias rebanhos, estudando diferentes linhagens, e conseqüentemente, levando a um padrão gênico e genotípico mais apurado da raça.

A tabela 6 mostra os resultados do teste Qui-quadrado (χ^2) relacionando categorias de produção com genótipos nas quatro lactações.

Tabela 6 – Tabela de contingência para o gene da κ -Cn entre genótipos e categorias de produção nas quatro lactações, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Genótipos	Categorias de Produção											
	Alta				Média				Baixa			
	1 ^a *	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
AA	7**	8	10	10	41	37	33	31	8	11	13	10
AB	2	4	4	2	12	9	10	10	0	1	0	0

χ^2 (1^a lac.)= 0.24^{ns} χ^2 (2^a lac.)= 2.36^{ns} χ^2 (3^a lac.)= 4,17^{ns} χ^2 (4^a lac.)= 3,15^{ns}
ns (p>0,05)

* 1^a, 2^a, 3^a e 4^a lactações

** n° de genótipos

Os resultados de χ^2 obtidos neste trabalho mostraram não haver efeito significativo na associação entre os alelos da κ -Cn com produção de leite. McLean *et al* (1984), McLean *et al* (1987), Aleandri *et al* (1990), Ng-kwai-Hang *et al* (1990) também não encontraram significância para a associação do gene da κ -Cn com produção de leite em animais da raça Holandesa.

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

O anexo 1 mostra os resultados das análises de variância nas quatro lactações separadas e juntas.

Os resultados encontrados na análise de variância também não mostraram diferença estatística significativa para a associação de produção de leite com genótipo da κ -Cn neste rebanho estudado. Embora tenha ocorrido sempre diferença de 200-350Kg entre os genótipos, com o AB apresentando maior média, não se pode afirmar que este marcador não seja válido para utilização em programas de seleção. Sendo necessário estudar maior número de amostras em diferentes rebanhos para conseguir mostrar se esta tendência pode ser

significativa ou se não se pode mesmo usar este marcador na seleção para produção de leite.

A associação entre o gene da κ -Cn e qualidade de leite não foi estudada devido à falta de dados necessários completos para serem utilizados no modelo estatístico. Também porque demandaria maior tempo de acompanhamento do rebanho estudado, tendo que acompanhar todas as suas lactações.

2.4. Conclusões

Não foi observada associação entre o gene da κ -Cn com produção de leite nos animais F₁ Girolando estudados.

As frequências genótípicas encontradas neste trabalho, para o gene da κ -Cn, foram de 80% para AA e 20% para AB. Não foi observado o genótipo BB em nenhuma das amostras testadas.

As frequências gênicas, para o gene da κ -Cn encontradas neste trabalho foram de 90% para A e 10% para B, o que mostra a tendência à fixação do alelo A.

2.5. Referências Bibliográficas

- ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L. G.; SCHNEIDER, J. C. The effects of milk polymorphism on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.*, v.73, p. 241-255, 1990.
- ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature*, v.176, p. 218-219, 1955.
- AYRES, M.; AYRES, M.JR.; AYRES, D.L. *Bioestat 2.0*. USP. São Paulo, 2000.
- BOVENHUIS, H.; JOHAN, A. M.; ARENDONK, V.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.*, v.75, p. 2549-2559, 1992.
- BRAUNSCHWEIG, M.; HAGGER, C.; STRANZINGER, G. Association between casein haplotypes and milk production traits of swiss brown cattle. *J. Dairy Sci.*, v.83, p. 1387-1395, 2000.
- CASTELHANO, E. C.; MERZEL, M.; PACKER, I. U. Determinação da frequência dos alelos "A" e "B" do gene de Kapa-caseína em bovinos da raça Guzerá. In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL*, 1, 1996, Ribeirão Preto. Anais... Viçosa: SBMA, 1996, p. 236-237.
- COWAN, C. M.; DENTINE, M. R.; COYLE, T. Chromosome substitution effects associated with κ -casein and β -lactoglobulin in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, v.75, p. 1097-1104, 1992.
- EENENNAAM, A. V.; MEDRANO, J. F. Milk protein polymorphisms in Califórnia dairy cattle. *J. Dairy Sci.* v.74, p. 1730-1742, 1992.
- EL-NEGOUMY, A. M. Effect of α s1-, β - and κ -casein polymorphism on the stability of calcium caseinate micelles in model systems. *J. Dairy Sci.* v.54, p. 1567-1574, 1971.
- EL-NEGOUMY, A. M. Effect of polymorphism on casein stability in salt solutions of varying complexity before and after freezing. *J. Dairy Sci.* v.39, p. 1170-1176, 1974.
- ERHARDT, G.; SENFT, B. Integration of milk protein variants in bovine breeding programmes using an economical screening method. *Ani. Genet.*, v.20 (1), p. 61, 1989.
- FARIA, F. J. C.; GUIMARÃES, S. E. F.; LIMA, R. M. G. Análise de polimorfismo do gene da κ -caseína em fêmeas da raça Nelore e efeito sobre o peso à desmama de suas progênies. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 51, n. 4, 1999.
- GONYON, D. S.; MATHER, R. E.; HINES, H. C. Association of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. *J. Dairy Sci.*, v.70, p. 2585-2598, 1987.
- IKONEN, T.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Association between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, p. 1026-1033, 1999.
- KEMENES, P. A.; REGITANO, L. C. A.; ROSA, A. J. M. κ -casein, β -Lactoglobulin and Growth Hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* v.22, n. 4, p.190-193, 1999.
- LEWIS, H. A.; STEWART-HAYNES, J. A simple method for DNA extraction from leucocytes for use in PCR. *Biotechniques*, v.13, n.4, p. 522-523, 1992.
- LIN, C. Y.; McALLISTER, K. F.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.69, p. 704-712, 1986.
- LIN, C. Y.; McALLISTER, K. F.; NG-KWAI-HANG, K. F. Relationships of milk protein types to lifetime performance. *J. Dairy Sci.*, v.72, p. 3085 - 3090, 1989.
- LITWINCZUK, Z.; KRÓL, J. Polymorphism of main milk proteins in beef cattle maintained in East-Central Poland. *Anim. Sci.*, v.20, supl.1, p. 33-40, 2002.

- MARZIALI, A. S.; NG-KWAIN-HANG. Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. *J. Dairy Sci.* v.69, p. 2533-2542, 1986.
- McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* v.51, n.4, p. 531-546, 1984.
- McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic variants and composition on heat stability of milk. *J. Dairy Res.* v.54, p. 219-235, 1987.
- MERCIER, J. C.; BRIGNON, G.; RIBADEAU-DUMAS, B. Structure primaire de la caséine κ bovine. Séquence complète. *Europ. J. Biochem.* v. 35, p. 222-235, 1973.
- NG-KWAIN-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J. Dairy Sci.* v. 67, p. 835-840, 1984.
- NG-KWAIN-HANG, K. F.; MONARDES, H. G.; HAYES, J. F. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* v.73, p.3414-3420, 1990.
- NG-KWAIN-HANG, K. F.; ZADWORNÝ, J. F.; KÜHNLEIN, U. Identification of κ -Casein genotype in Holstein sires: A comparison between analysis of milk samples from daughters and direct analysis of semen samples from sires by polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* v. 74, p. 2410-2415, 1991.
- PINDER, S. J.; PERRY, B. N.; SKIDMORE, C. J. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. *Anim. Genet.* v. 22, p.11-20, 1991.
- RAHALI, V.; MÉNARD, J. L. Influence des variants génétiques de la β -lactoglobuline et de la κ -caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait*, v.71, p. 275-297, 1991.
- ROGNE, S.; LIEN, S.; VEGARUD, G. A method for κ -casein genotyping of bulls. *Anim. Genet.* v.20, p. 317-321, 1989.
- SABOUR, M. P.; LIN, C. Y.; KEOUGH, A. Effects of selection practiced on the frequencies of κ -casein and β -Lactoglobulin genotypes in Canadian Artificial insemination Bulls. *J. Dairy Sci.*, v.76, p. 274-280, 1993.
- SAS User's guide for windows: statistics. Cary: North Carolina, SAS Institute Inc., p. 642, (Version 6.09), 1994.
- SILVA, I. T.; DEL LAMA, M. A. Milk protein polymorphism in Brazilian Zebu cattle. *Braz. J. Genet.* v. 20, n. 4, p.625 - 630, 1997.
- VALENTE, E. P. *Levantamento das frequências dos fenogrupos do sistema B de grupos sanguíneos e dos alelos A e B do gene da κ -Cn em populações das raças Holandesa e Gir do estado de Minas Gerais.* Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Melhoramento Animal. Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- ZADWORNÝ, D.; KUHNLEIN, U. The identification of Kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* v.80, n.5, p. 631-634, 1990.
- YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J. Botany*, v.129, p.157, 1997.

3. Capítulo 2 - ASSOCIAÇÃO DO GENE DA BETA-LACTOGLOBULINA (β -Lg) COM PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS F₁ GIROLANDO

Resumo

Foram utilizados 70 animais F₁ Girolando, provenientes de uma única fazenda de um Município de Felixlândia em Minas Gerais. O presente estudo teve como objetivo associar o gene da β -Lg com produção de leite, bem como levantar suas frequências genotípicas e gênicas. Os resultados mostraram estar de acordo com a literatura quanto às frequências, sendo 7,14% AA e 57,14% AB e 35,71% BB, e 80% A e 20% B. Não houve efeito significativo para a associação entre o marcador e produção de leite.

Abstract

In this study 70 F₁ Girolando animals from one single farm of one town in Minas Gerais were used, with the goal of associating the β -Lg gene with milk production, as well as showing their genotypic and genetic frequencies. The results showed, in agreement with the literature concerning the frequencies, being 7,14% AA and 57,14% AB and 35,71% BB and 80% A and 20% B. There was no significance towards association.

3.1. Revisão bibliográfica

A β -Lg foi a primeira proteína que teve os polimorfismos evidenciados. Em 1955, Aschaffenburg e Drewry observaram, por eletroforese em papel, duas bandas distintas denominadas β_1 e β_2 . Em 1957, a descoberta foi confirmada e o nome das bandas passou a ser A e B, de acordo com a mobilidade eletroforética. Até hoje foram observadas doze variantes da β -Lg, de A a J, W e Dr, sendo a A e B difundidas em todas as raças. A variante mais comum, B,

consiste de 162 aminoácidos prevalecendo em algumas raças Européias como Ayrshire, Shorthorn, Red Danish, e em Zebu Asiático e Africano (85-95%). Em gado Holandês, e em muitas outras raças, os dois alelos apresentam a mesma frequência. Em 1966, Grosclaude *et al* encontraram a variante denominada D nas raças Monbéliarde e em raças alemãs (não especificadas) (citado por Formaggioni *et al*, 2003).

A β -Lg é a maior proteína da fração solúvel encontrada no leite bovino e o gene que a codifica localiza-se no cromossomo 11. Foi utilizada muitos anos como modelo para estudos enzimáticos e estruturais a respeito da denaturação e ligação entre íons e proteínas. Sua função biológica ainda não está estabelecida, mas deve estar envolvida no metabolismo e transporte de retinol e ácidos graxos (Formaggioni *et al*, 2003). Em torno de 20% do conteúdo total das proteínas do leite são, formadas por proteínas do soro, sendo a β -Lg a principal (Braunschweig *et al*, 2000).

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi também utilizada para amplificar e clonar uma região do loco da β -lactoglobulina, entre os éxons 4 e 5 (849pb). A análise da sequência da região clonada revelou duas novas substituições de bases que foram diferenciadas nas formas A e B. A mutação foi localizada na sequência do íntron entre os dois éxons, na posição 276 (Timina no alelo A e Citosina no alelo B) e 562 (Timina no alelo A e Guanina no alelo B) do fragmento clonado. Estas substituições de nucleotídeos resultam em alelo específico do perfil de restrição, que pode ser usado como marcador genético. De acordo com Reklewski e Lukaszewicz (citados por Litwinczuk e Król, 2002), a seleção de gado leiteiro baseada em marcadores genéticos pode incrementar em 5% o melhoramento genético quando comparada com a seleção tradicional.

No quadro 2 pode-se observar as frequências gênicas e genotípicas do gene da β -Lg, descritas em vários estudos feitos com as raças zebuínas e taurinas.

Quadro 2 – Relação das frequências genotípicas e gênicas do gene da β -Lg, citadas em alguns trabalhos de pesquisa.

Raça	Freq. Genotípicas			N	Freq. Gênicas		Referência
	AA	AB	BB		A	B	
<i>Holandês</i>	13,44	50,54	36,02	3870	38,7	61,3	Ng-Kwai-Hang <i>et al</i> , 1984
<i>Holandês</i>	3,7	38,7	57,6	377	23	77	Lin <i>et al</i> , 1986
Ayrshire	1,9	27,9	70,2	158	16	84	
<i>Holandês</i> x Ayrshire	2,7	39,7	57,6	373	23	77	
<i>Holandês</i>	28,45	49,76	21,79	3571	53,33	46,67	Gonyon <i>et al</i> , 1987
<i>Holandês</i>	10,73	49,31	39,96	8469	35	65	Ng-Kwai-Hang <i>et al</i> , 1990
<i>Holandês</i>	17,1	47,7	35,1	2005	40,95	58,95	Aleandri <i>et al</i> , 1990
<i>Holandês</i>	-	-	-	115	43	57	Eenennaam & Medrano, 1991
Jersey	-	-	-	172	37	63	
Pardo Suíço	-	-	-	50	39	61	
Guernsey	-	-	-	40	21	79	
Shorthorn	-	-	-	40	31	69	
<i>Holandês</i>	19,5	51	29,5	779	45	55	Rahali & Ménard, 1991
<i>Holandês</i>	24	42	34	641	45	55	Sabour <i>et al</i> , 1993
Ayrshire	17	49	34	132	41	59	
Jersey	45	45	10	20	68	32	
<i>Holandês</i>	30,3	43,7	25,9	112	52	48	Ron <i>et al</i> , 1994
<i>Holandês</i>	74	23	3	566	85,5	14,5	Sabour <i>et al</i> , 1996
Gir	-	-	-	283	36	64	Silva & Del Lama, 1997
Guzerá	-	-	-	205	14	86	
Sindi	-	-	-	22	5	95	
nelore	-	-	-	17	44	56	
Gir fêm. sel.*	3,33	63,33	33,33	30	35	65	Neves, 1998
Gir fêm. ñ. sel. **	20,51	48,72	30,77	39	45	55	
Gir mac. ***	19,23	42,31	38,46	26	40	60	
Nelore fêm. sel.	2,5	35	62,5	40	20	80	
Nelore fêm. ñ sel.	20	26,67	53,33	30	33	67	
Finnish Ayrshire	7,8	41,3	50,9	18686	28,5	71,5	Ikonen <i>et al</i> , 1999
Nelore	1	30	69	81	16	84	Faria <i>et al</i> , 2000
<i>Holandês</i>	6	41,4	52,5	99	27	73	Celik, 2003
Pardo Suíço	17,2	53,8	28,9	145	44	56	

* fêmea selecionada para leite

** fêmea não selecionada para leite

*** macho

Neste quadro podemos observar que na maioria dos trabalhos há maior frequência do alelo B e o do genótipo AB nas raças Holandesa e Gir. Também o relato de algumas diferenças onde o alelo A (Gonyon *et al*, 1987; Ron *et al*, 1994) e os genótipos AA (Sabour *et al*, 1996) ou BB (Lin *et al*, 1986) mostraram-se em maior frequência.

Alguns trabalhos mostram relação entre o alelo A com produção de leite, embora outros não apresentem significância para esta associação. Em estudo com animais da raça Holandesa, nas três primeiras lactações, Ng-Kwai-Hang *et al* (1990) observaram as frequências genotípicas de 10,73% AA, 49,31% AB e 39,96% BB, e associação significativa com conteúdo de proteína. Ao passo que rendimento de leite e conteúdo de gordura não apresentaram associação, o que está de acordo com Brum *et al* (1968); Cerbulis e Farrel (1974); Gonyon *et al* (1987); Haenlein *et al* (1987); Lin *et al* (1986); Mc Lean *et al* (1984). No entanto, Jairam e Nair (1983) demonstraram produção superior para vacas com genótipo BB no que diz respeito a produção de leite em concordância com Marziali & Ng-Kwai-Hang (1986); Grosclaude (1988) e Aleandri *et al* (1990) e discordância com Arave *et al* (1971); Atroshi *et al* (1982); Comberg *et al* (1964) onde a variante A foi relacionada com maior produção de leite. Segundo Cowan *et al* (1992) o genótipo AA apresentou aumento não significativo no rendimento de leite, e Bovenhuis *et al* (1992) mostraram que animais BB produzem 93Kg menos que os AA, com efeito significativo na produção de leite e rendimento de proteína.

Em muitos países os estudos nesta área estão bem avançados na raça Holandesa. Mas o que se refere aos zebuínos leiteiros ainda existe uma lacuna. Hoje somente Austrália e os Estados Unidos estão pesquisando o grupo *Bos indicus*, dando maior relevância às raças de corte, principalmente à Brahman. Existem alguns laboratórios no Brasil que prestam serviço de genotipagem para marcadores moleculares para leite e para corte. No entanto, estes marcadores foram desenvolvidos para raças taurinas não estando devidamente validados para as raças zebuínas e suas cruzas.

Este trabalho teve como objetivo determinar se há associação da β -Lg com a produção de leite e

também as frequências gênicas e genotípicas em rebanho de animais F₁ Girolando.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Composição da Amostra

Foram analisadas amostras de sangue e/ou pêlo de 70 animais F₁ Girolando, constituídos por fêmeas entre primeira e quarta lactação, provenientes de fazenda localizada no Município de Felixlândia no Estado de Minas Gerais.

3.2.2. Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue foi extraído segundo o protocolo descrito por Lewin e Stewart-Haynes (1992), e as de pêlo segundo técnica do Veterinary Genetics Laboratory - UCDavis - USA. (não publicado). Realizadas no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG.

3.2.3. Análise do marcador β -Lg por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para estudo do loco que codifica a β -Lg, foram feitas amplificações pela PCR com *primers* específicos e digestão com a enzima de restrição Hae III.

3.2.3.1 – *Primers*

O desenho dos primers utilizados foram descritos por Medrano e Aguilar-Cordova (1990).

Primer 1

5' - GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA - 3'

Primer 2

5' - CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA - 3'

3.2.3.2 – A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – protocolo e programa

O protocolo para amplificação e programa de PCR para genotipagem da β -Lg, empregado neste trabalho encontra-se descrito na tabela 1 e 2, respectivamente.

3.2.3.3 – Digestão com enzima de restrição

O protocolo para digestão com enzima Hae III apresenta-se descrito na tabela 3.

Os produtos de DNA conseguidos pela PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição Hae III que gera fragmentos de 153 e 109 pares de base (pb) para o genótipo AA; 153, 109, 79 e 74 pb para o AB e 109, 79 e 74 pb para o BB, e a amostra sem corte é representada por um fragmento de 262 pb.

Tabela 1 - Protocolo mix de amplificação do gene da β -Lg (vol. final 25 μ l/amostra), em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

REAGENTES	VOLUME (μ l)
H ₂ O Milli-Q	12
Tampão especial 5x (Phoneutria)	5
DNTP (10 mM)	1
Primers (10 pmol/ μ l)	1,5 (0,75 μ l cada)
Taq polimerase (5u/ μ l)	0,2
DNA (100 ng/ μ l)	5,0

Tabela 2 - Programa de PCR para o gene da β -Lg (25 ciclos) em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Passo 1	4 min.	94° C
Passo 2	1 min.	94° C
Passo 3	1 min.	60° C
Passo 4	1 min.	72° C
Passo 5		+24 ciclos (passos 2 a 4)
Passo 6	5 min.	72° C
Passo 7	2 horas	4° C

Tabela 3 - Protocolo mix PCR para Hae III. (Vol. final 20 μ l), em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG.

REAGENTES	VOLUME (μ l)
H ₂ O Milli-Q	4,89
Tampão (REact 10x Invitrogen)	2,25
Enzima (Invitrogen)	0,4
Produto mix PCR	15

O tempo e temperatura de corte, no termociclo, das enzimas de restrição foram de 2 horas a 37°C.

Os produtos da digestão da enzima de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% a 100V por 2 horas. Colocando-se sempre uma amostra não digerida e outra de genótipo conhecido AB, como controle do corte da enzima, e uma amostra sem DNA, para controle de contaminação do mix de PCR.

3.2.3.4 – Coloração dos géis

A visualização das bandas foi feita pela coloração do gel utilizando o método do Nitrato de Prata. Após a coloração o gel foi analisado em transiluminador de luz branca e fotografado com câmera digital.

3.2.4. Análise de dados

Para verificar a associação entre marcador e produção de leite utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2), mediante tabela de contingência, e também análise de variância (ANOVA) com emprego do pacote estatístico SAS (SAS, 1994). Segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + AN_i + GEN_j + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} é a produção ajustada aos 305 dias

μ é a média da população

AN_i é o efeito fixo de ano de nascimento (1995 a 2000)

GEN_j é o efeito fixo de genótipo do gene da β -Lg (AA, AB e BB)

e_{ijk} é o erro aleatório

As frequências gênicas e genóticas foram obtidas por meio do programa Popgene versão 1.31 (Yeh & Boyle, 1997).

Foram feitos ajustes para 305 dias de produção nas quatro lactações estudadas, por meio de média, onde empregou-se a fórmula $P_{305} = \sum (PD \times DI) + (UP \times D_{305})$, onde:

PD é a produção no dia do controle

D são os dias desde a última pesagem

UP é a última produção pesada

D_{305} são os dias faltantes para chegar aos 305 dias de produção

Os valores de produções ajustados foram dispostos em categorias (1 - alta, 2 - média e 3 - baixa). Para tal, utilizou-se curva de distribuição obtida pelo programa estatístico BioEstat 2.0 (Ayres *et al*, 2000). A tabela de contingência foi elaborada com as três categorias e os genótipos relacionados a cada uma delas.

3.3. Resultados e Discussão

Entre os 70 animais F_1 Girolando analisados 7,14% apresentaram o genótipo AA, 57,14% eram AB e 35,71% BB. A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hard-Weinberg. Os genótipos encontrados neste trabalho estão demonstrados na figura 1.

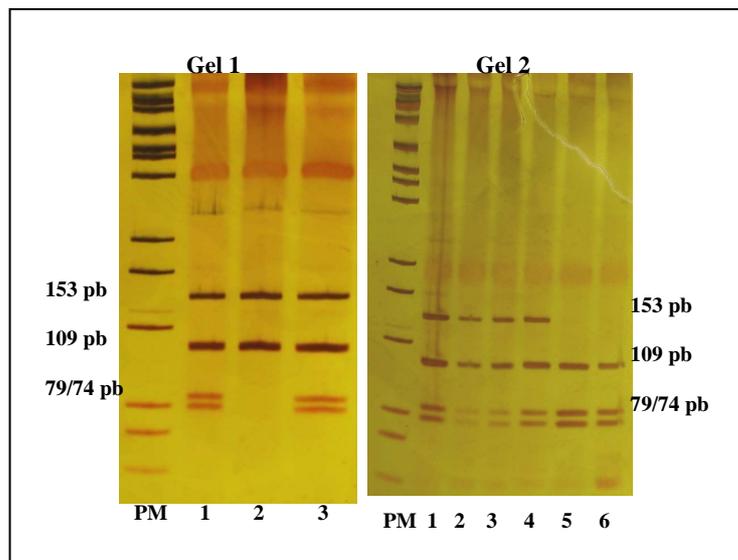


Figura 1 – Gel de poliacrilamida a 8% mostrando os fragmentos do gene da β -Lg digeridos com a enzima de restrição Hae III, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006.

PM: Padrão de peso molecular

Gel 1 - canaletas 1 e 3: genótipo AB
canaleta 2: genótipo AA

Gel 2 - canaletas 1, 2, 3, e 4: genótipo AB
canaletas 5 e 6: genótipo BB

As freqüências gênicas e genotípicas encontradas para o loco da β -Lg estão representadas nas tabelas 4 e 5. As freqüências observadas neste trabalho estão de acordo com a literatura, onde o genótipo AB apresentou a freqüência maior (Ng-Kwai-Hang *et al*, 1990; Cowan *et al*, 1992 e Aleandri *et al* (1990) e também maior freqüência do alelo B, como descrito anteriormente em zebuínos e na raça Holandesa (Eenennaam e Medrano, 1991; Aleandri *et al*, 1990; Neves, 1998).

A tabela 6 mostra os resultados do teste Qui-quadrado (χ^2) relacionando categorias de produção com genótipos nas quatro lactações.

Tabela 4 - Freqüência dos alelos do gene da β -Lg, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Alelos	Freqüência (%)
A	64
B	36

Tabela 5 - Freqüência dos genótipos do gene da β -Lg, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Genótipos	Freqüência (%)
AA	7,14
AB	57,14
BB	35,71

Tabela 6 – Tabela de contingência para gene da β -Lg entre genótipos e categorias de produção nas quatro lactações, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Genótipos	Categorias de Produção											
	Alta				Média				Baixa			
	1 ^{a*}	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
AA	1 ^{**}	0	0	0	3	4	4	8	1	1	1	3
AB	5	9	12	5	32	26	22	22	18	6	17	15
BB	1	3	2	0	3	17	17	5	4	5	6	5

χ^2 (1^a lac.)= 1.84^{ns}
ns (p>0,05)

χ^2 (2^a lac.)= 2.32^{ns}

χ^2 (3^a lac.)= 6,21^{ns}

χ^2 (4^a lac.)= 3,98^{ns}

* 1^a, 2^a, 3^a e 4^a

** n^o genótipos

Os resultados de χ^2 obtidos neste trabalho mostram não haver efeito significativo na associação entre os alelos da β -Lg com produção de leite. McLean *et al* (1984), McLean *et al* (1987), Ng-kwai-Hang *et al* (1990) e Lin *et al* (1986) também não encontraram efeito significativo para a associação do gene da β -Lg com produção de leite em animais da raça Holandesa. No entanto, Aleandri *et al* (1990) e Bovenhuis *et al* (1992) observaram que o genótipo AA apresenta maior produção de leite, em animais Holandeses para a primeira lactação.

Os resultados conflitantes encontrados na literatura parecem estar relacionados a diferenças no tamanho da população, diferença de raças, frequência de ocorrência de variáveis genéticas específicas, métodos de expressão das características (rendimento de lactação e composição), e o mais importante, ao rigor da análise estatística para ajustar outros fatores como idade da vaca, número de partos, estágio de lactação e efeitos de outras variáveis genéticas (Ng-Kwai-Hang *et al*, 1990).

Os marcadores genéticos utilizados em programas de seleção foram desenvolvidos para raças taurinas, não estando validados para as raças zebuínas e suas cruzas. O presente trabalho foi feito com mestiços ½ Gir x Holandês, demonstrando a importância da elaboração de mais estudos como este, em amostragem maior e em outros rebanhos, afim de estabelecer a validade do emprego destes marcadores (κ -Cn e β -Lg) em programas de seleção.

O anexo 2 mostra os resultados das análises de variância nas quatro lactações separadas e juntas.

Os resultados encontrados na análise de variância também não mostraram significância para a associação de produção de leite com genótipo neste rebanho estudado. Embora tenha ocorrido sempre diferença de 150-400Kg entre os genótipos, com o AB apresentando maior média, não se pode afirmar que este marcador não seja válido para utilização em programas de seleção. Sendo necessário estudar maior número de amostras em diferentes rebanhos para conseguir mostrar se esta tendência pode ser significativa ou se não se pode mesmo usar este marcador na seleção para produção de leite.

3.4. Conclusões

Não foi observada associação entre o gene da β -Lg com produção de leite nos animais F₁ Girolando estudados.

As frequências genotípicas encontradas para o gene da beta-lactoglobulina foram de 7,14% para AA, 57,14% para AB e 35,57% para BB, o que demonstra haver excesso de heterozigotos nesta população.

As frequências gênicas observadas para as amostras analisadas neste trabalho foram de 64% para o alelo A e 36% para o alelo B.

3.5. Referências Bibliográficas

- ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L. G.; SCHNEIDER, J. C. The effects of milk polymorphism on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.*, v.73, p. 241-255, 1990.
- ARAVE, C. W.; LAMB, R. C.; HINES, H. C. Blood and milk protein polymorphism in relation to feed efficiency and production traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.54, p. 106, 1971.
- ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature*, v.176, p. 218-219, 1955.
- ATROSHI, F.; KANGASNIEMI, R.; HONKANON-BUZALSKI, t. Beta-lactoglobulin phenotypes in Finnish Ayrshire and Friesian cattle with special reference to mastitis indicators. *Acta Vet. Scand.*, v.22, p. 135, 1982.
- AYRES, M., AYRES, M. J. R., AYRES, D.L. *Bioestat 2.0*. USP. São Paulo, 2000.
- BOVENHUIS H.; JOHAN, A. M.; ARENDONK, V.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.*, v.75, p. 2549-2559, 1992.
- BRAUNSCHWEIG, M.; HAGGER, C.; STRANZINGER, G. Association between casein haplotypes and milk production traits of swiss brown cattle. *J. Dairy Sci.*, v.83, p. 1387-1395, 2000.
- BRUM, E. W.; RAUSCH, W. H.; HINES, H. Association between milk and blood polymorphism types and lactation traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, v.51, p. 1031, 1968.
- CELIK, S. β -lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. *Int. Dairy Sci.* v. 13, p. 727-731, 2003.
- CERBULIS, J.; FARREL JR., H. M. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.*, v.58, n.6, p. 817-827, 1974.
- COMBERG, G. H.; MEYER; GROWING, M. Correlation between beta-lactoglobulin types in cattle and age at first calving, milk yield and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.*, v. 36, p. 248, 1964.
- COWAN, C. M.; DENTINE, M. R.; COYLE, T. Chromosome substitution effects associated with κ -casein and β -lactoglobulin in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, v.75, p. 1097-1104, 1992.
- EENENNAAM, A. V.; MEDRANO, J. F. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* v.74, p. 1730-1742, 1991.
- FARIA, F. J. C.; GUIMARÃES, S. E. F.; MOURÃO, G. B. Análise de polimorfismos do gene da β -lactoglobulina em vacas da raça Nelore e efeitos sobre o peso à desmama de suas progênies. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* v. 52, n. 3, 2000.
- FORMAGGIONI, P.; SUMMER, A.; MALACARNE, M. *Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus*. Disponível em: <<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>>. Acessado em 13-10-2003.
- GONYON, D. S.; MATHER, R. E.; HINES, H. C. Association of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. *J. Dairy Sci.*, v.70, p. 2585-2598, 1987.
- GROSCLAUDE, F. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *Inst. Natl. Rech. Agrop. Prod. Anim.*, v. 1, p. 5, 1988.
- HAENLEIN, G. F. W.; GONYON, D. S.; MATHER, R. E. Association of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Guernseys. *J. Dairy Sci.*, v.70, p. 2599, 1987.
- IKONEN, T.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Association between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, p. 1026-1033, 1999.

- JAIRAM, B. T.; NAIR, P. G. Genetic polymorphisms of milk proteins and economic characters in dairy animals. *Indian J. Anim.*, v. 53, p. 1, 1983.
- LEWIN, H. A.; STEWART-HAYNES, J. A simple method for DNA extraction from leucocytes for use in PCR. *Biotechniques*, v.13, n.4, p. 522-523, 1992.
- LIN, C. Y.; McALLISTER, K. F.; NG-KWAIN-HANG, K. F. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.69, p. 704 -712, 1986.
- LITWINCZUK, Z.; KRÓL, J. Polymorphism of main milk proteins in beef cattle maintained in East-Central Poland. *Anim. Sci.*, v.20, supl.1, p. 33-40, 2002.
- MARZIALI, A. S.; NG-KWAIN-HANG. Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. *J. Dairy Sci.* v.69, p. 2533-2542, 1986.
- McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* v.51, n.4, p. 531-546, 1984.
- McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic variants and composition on heat stability of milk. *J. Dairy Res.* v.54, p. 219-235, 1987.
- MEDRANO, J. F.; AGUILAR-CORDOVA, E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Anim. Biot.*, v. 1, p. 73-77, 1990.
- NEVES, A. L. G. *Identificação dos alelos da β -lactoglobulina em populações de bovinos das raças Gir e Nelore*. 1998. Dissertação (mestrado em Ciência Animal, Melhoramento Animal). Universidade Federal de Minas Gerais.
- NG-KWAIN-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J. Dairy Sci.* v. 67, p. 835-840, 1984.
- NG-KWAIN-HANG, K. F.; MONARDES, H. G.; HAYES, J. F. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* v.73, p.3414-3420, 1990.
- RAHALI, V.; MÉNARD, J. L. Influence des variants génétiques de la β -lactoglobuline et de la κ -cáseine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait*, v.71, p. 275-297, 1991.
- RON, M.; YOFFE, O.; EZRA, E. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. *J. Dairy Sci.* v.77, p.1106-1113, 1994.
- SABOUR, M. P.; LIN, C. Y.; KEOUGH, A. Effects of selection practiced on the frequencies of κ -casein and β -Lactoglobulin genotypes in Canadian Artificial insemination Bulls. *J. Dairy Sci.*, v.76, p. 274-280, 1993.
- SABOUR, M. P.; LIN, C. Y.; LEE, A. J. Association between protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits. *J. Dairy Sci.*, v.79, p. 1050-1056, 1996.
- SAS User's guide for windows: statistics. Cary: North Carolina, SAS Institute Inc., p. 642, (Version 6.09), 1994.
- SILVA, I. T.; DEL LAMA, M. A. Milk protein polymorphism in Brazilian Zebu cattle. *Braz. J. Genet.* v. 20, n. 4, p. 625 – 630, 1997.
- YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J. Botany*, v.129, p.157, 1997.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Não foi observada associação entre o gene da κ -Cn com produção de leite nos animais F₁ Girolando estudados.

As frequências genótípicas encontradas neste trabalho, para o gene da κ -Cn, foram de 80% para AA e 20% para AB. Não foi observado o genótipo BB em nenhuma das amostras testadas.

As frequências gênicas, para o gene da κ -Cn encontradas neste trabalho foram de 90% para A

e 10% para B, o que mostra a tendência à fixação do alelo A.

Não foi observada associação entre o gene da β -Lg com produção de leite nos animais F₁ Girolando estudados.

As frequências genótípicas encontradas para o gene da beta-lactoglobulina foram de 7,14% para AA, 57,14% para AB e 35,57% para BB, o que demonstra haver excesso de heterozigotos nesta população.

As frequências gênicas observadas para as amostras analisadas neste trabalho foram de 64% para o alelo A e 36% para o alelo B.

5 - ANEXOS

Anexo 1 – ANOVA para o gene da κ -Cn, nas quatro lactações separadamente e juntas, relacionando genótipos, ano de nascimento da vaca e produção aos 305d, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UFMG em 2006

Genótipos	Lactações									
	1ª		2ª		3ª		4ª		Juntas	
	X +/- DP	N								
AA	2120,3 +/- 474,4	56	3062,5 +/- 803,9	56	3445,5 +/- 827,5	56	3747,3 +/- 760,8	56	3079,0 +/- 948,1	219
AB	2359,8 +/- 530,8	14	3338,6 +/- 688,6	14	3798,5 +/- 755,1	14	3976,1 +/- 653,8	14	3345,7 +/- 902,7	54

CV (1ª lac.)= 23,44^{ns} CV (2ª lac.)= 23,87^{ns} CV (3ª lac.)= 22,79^{ns} CV (4ª lac.)= 20,01^{ns} CV (juntas)= 29,95^{ns} ns (p>0,05)
X - média de produção de leite
DP - Desvio Padrão
N - nº de genótipos

Anexo 2 – ANOVA para o gene da β -Lg, nas quatro lactações separadamente e juntas, relacionando genótipos, ano de nascimento da vaca e produção aos 305d, em ensaio realizado no Laboratório de Genética da EV/UMG em 2006

Genótipos	Lactações									
	1ª		2ª		3ª		4ª		Juntas	
	X +/- DP	N								
AA	2018,9 +/- 659,0	5	2913,8 +/- 497,6	5	3392,8 +/- 904,6	5	3694,8 +/- 524,9	5	3005,1 +/- 892,6	20
AB	2233,8 +/- 466,4	40	3229,5 +/- 843,8	40	3682,5 +/- 724,6	40	3870,3 +/- 772,1	40	3234,1 +/- 976,0	155
BB	2093,2 +/- 501,6	25	2979,6 +/- 725,2	25	3274,5 +/- 724,6	25	3690,9 +/- 747,2	25	2995,6 +/- 890,8	98

CV (1ª lac.)= 23,89^{ns} CV (2ª lac.)= 24,15^{ns} CV (3ª lac.)= 23,24^{ns} CV (4ª lac.)= 19,42^{ns} CV (juntas)= 30,06^{ns} ns (p>0,05)
X - média de produção de leite
DP - Desvio Padrão
N - nº de genótipos

