**QUANTIFICAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS “A” E “B”
DOS GENES DE KAPPA-CASEINA E β -LACTOGLOBULINA
EM ALGUMAS RAÇAS BOVINAS**

PAOLA AUGUSTA KEMENES
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Luiz Lehman Coutinho

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Kemenes, Paola Augusta

Quantificação das frequências dos alelos "A" e "B" dos genes de Kappa-Caseína e β -Lactoglobulina em algumas raças bovinas. Piracicaba, 1996.
85p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bovino - Gene - Frequência 2. Genética de população 3. Marcador molecular
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 574.87328
636.2

**QUANTIFICAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS “A” E “B”
DOS GENES DE KAPPA-CASEINA E β -LACTOGLOBULINA
EM ALGUMAS RAÇAS BOVINAS**

PAOLA AUGUSTA KEMENES

Aprovada em: 05 . 03 . 1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Luiz Lehman Coutinho

ESALQ - USP

Dr. Antonio Emidio D. F. Silva

EMBRAPA - CPPSE

Alexander George Razook

IZ - SERTÃOZINHO

Prof. Dr. LUIZ LEHMAN COUTINHO

Orientador

*... caminante no hay camino
se ~~h~~ace camino al andar.*

*Al andar se hace camino
y al volver la vista atras
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante no hay camino,
sino estelas en la mar...*

(Antonio Machado)

*Aos meus pais Beatriz e José Alexandre
pelo carinho e constante apoio.*

DEDICO

*Ao Francisco, pelo amor,
bondade e grande ajuda,*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pela imensa alegria de viver;
- À toda minha família, em especial meus irmãos Juliana e Alexandre e minhas avós Julia e Elma pelo carinho constante;
- Ao Prof. Dr. Luiz Lehman Coutinho, pela orientação para a realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Irineu Parker e ao Prof. Dr. Roland Vencovsky pela ajuda na análise dos dados;
- Aos Professores do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP pelos ensinamentos durante o curso de Mestrado;
- Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, em especial a Claudia e a Vera pela simpatia, colaboração e amizade;
- Às funcionárias da Biblioteca Central da ESALQ/USP Kátia e Eliana pelo auxílio durante as revisões para elaboração deste trabalho;
- À grande amiga Elizabeth, por tudo que me ensinou dentro e fora do laboratório;
- Aos meus queridos amigos do curso de Mestrado, por muitos momentos de alegria e pelo apoio nas situações difíceis;
- Ao Bruno pelos slides;
- À todos meus amigos que mesmo distantes apoiaram e colaboraram com este trabalho;
- A EMBRAPA-CPPSE pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho;
- À EMBRAPA-CPPSE, IZ-Sertãozinho, IZ-Ribeirão Preto, Fazenda do Madú, Usina São Geraldo e a ESALQ por ceder os animais para coleta de amostras;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	v
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1-Aspectos Gerais das Raças Holandesa, Nelore, Gir e Caracu.....	3
2.1.1-Raça Holandesa.....	3
2.1.2- Raça Nelore e Raça Gir.....	5
2.1.3- Raça Caracu.....	6
2.2- Proteínas do Leite.....	8
2.2.1-Caseínas.....	8
2.2.2- Proteínas do Soro.....	11
2.3- Polimorfismo Genético das Proteínas do Leite.....	12
2.3.1- Detecção do Polimorfismo Genético.....	15
2.3.2- Polimorfismo Associado a Características de Produção	16
2.4- Marcadores Moleculares.....	19
2.5-Reação em Cadeia da Polimerase.....	20
2.6-Alguns Parâmetros em Genética de Populações.....	23
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	26
3.1- Materiais.....	26
3.1.1-Soluções e Tampões.....	26
3.2- Métodos.....	28
3.2.1- Obtenção das Amostras.....	28
3.2.2- Extração de DNA.....	29
3.2.3- Amplificação do DNA.....	30

3.2.3.1- Amplificação do Loco de Kappa-Caseína.....	30
3.2.3.2- Amplificação do Loco de β - Lactoglobulina.....	31
3.2.4- Digestão das Amostras Amplificadas.....	32
3.2.5- Eletroforese em Gel de Agarose.....	33
3.2.6- Vizualização dos Fragmentos de DNA.....	34
3.3 Análise dos Genótipos.....	34
3.3.1- Cálculo da Frequência Genotípica.....	35
3.3.2- Cálculo da Frequência Gênica e Erro-Padrão.....	36
3.3.3- Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	37
3.3.4- Teste de Homogeneidade.....	37
3.3.5- Distância Euclidiana Média (DEM).....	38
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	39
4.1- Determinação dos Genótipos.....	39
4.1.1- Kappa- Caseína.....	39
4.1.2- β -Lactoglobulina.....	40
4.2- Frequências Gênicas e Genotípicas.....	43
4.2.1- Raça Holandesa.....	43
4.2.2- Raça Nelore.....	49
4.2.3- Raça Gir.....	52
4.2.4- Raça Caracu.....	56
4.3- Distância Genética.....	59
4.4- Considerações Finais.....	67
5. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

QUANTIFICAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS “A” E “B” DOS GENES DE KAPPA-CASEINA E β -LACTOGLOBULINA EM ALGUMAS RAÇAS BOVINAS

Autora : Paola Augusta Kemenes

Orientador : Luiz Lehman Coutinho

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar as frequências dos alelos A e B dos genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina nas raças Holandesa, Nelore, Gir e Caracu, e também analisar a distância genética entre estas raças com base nos locos estudados.

Foram analisados 89 animais da raça Holandesa, 118 animais da raça Nelore, 83 animais da raça Gir e 79 animais da raça Caracu. Para todas as raças com exceção da Caracu, as amostras foram provenientes de dois ou mais rebanhos.

O genótipo dos animais para o gene de kappa-caseína foi detectado através da amplificação de um fragmento de 350 pares de bases, que foi posteriormente digerido com a enzima *Hinf I*. Os fragmentos de DNA obtidos após a digestão foram separados por eletroforese. As frequências obtidas para o alelo A do gene de kappa-caseína foram 0,81; 0,92; 0,93 e 0,72 para as raças Holandesa, Nelore, Gir e Caracu respectivamente. Para este loco apenas a raça Caracu não se apresentou em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para detecção dos genótipos do gene de β -lactoglobulina, foi amplificada uma sequência de 247 pares de bases, seguida de digestão pela enzima *Hae III*. As frequências obtidas para o alelo A do gene de β -lactoglobulina foram 0,40; 0,33; 0,37 e 0,51 para as raças Holandesa, Nelore, Gir e Caracu respectivamente. Para este loco apenas a raça Holandesa apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os rebanhos estudados.

A similaridade entre as raças foi analisada através do cálculo da distância euclidiana média entre as raças, sendo os valores obtidos agrupados pelo método das médias das distâncias ou UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages).

As análises foram feitas utilizando-se apenas cada um dos locos individualmente, ou os dois locos em conjunto. O loco de kappa-caseína utilizado individualmente foi o que melhor permitiu agrupar as raças de acordo com suas espécies. As distâncias euclidianas médias calculadas a partir deste loco, permitiram a formação de dois grupos: um com as raças Nelore e Gir, havendo 1,42% de dissimilaridade entre elas, e outro com as raças Holandesa e Caracu com 9,17% de dissimilaridade. Entre os dois grupos a distância euclidiana média obtida foi de 0,1645, indicando 16,45% de dissimilaridade. O loco de β -lactoglobulina não permitiu um bom agrupamento das raças, o mesmo ocorrendo com a análise feita a partir dos dois locos em conjunto.

O loco de kappa-caseína, apesar de permitir um bom agrupamento das raças estudadas, parece não ser um bom indicador da aptidão dos animais, já que as frequências gênicas obtidas nas diferentes populações foi bastante semelhante, inclusive entre animais de diferentes aptidões (carne e leite).

DETERMINATION OF FREQUENCIES OF “A” and “B” ALLELES FOR KAPPA-CASEIN AND β -LACTOGLOBULIN GENES IN DIFFERENT BOVINE BREEDS

Author: Paola Augusta Kemenes

Adviser: Luiz Lehman Coutinho

SUMMARY

Genotypes for kappa-casein and β -lactoglobulin genes were determined by polymerase-chain-reaction (PCR) and restriction enzyme digestion in four breeds of cattle: Holstein, Nelore, Gir and Caracu.

The genotype for kappa-casein was determined by amplification of a 350 base pairs fragment, followed by digestion by *Hinf I* endonuclease. Frequencies of the A allele were 0.81, 0.92, 0.93 and 0.72 for Holstein, Nelore, Gir and Caracu breeds respectively. For kappa-casein locus just Caracu breed did not follow the Hardy-Weinberg equilibrium.

The genotype for β -lactoglobulin was determined by a 247 base pairs fragment amplification, and digestion of the amplified product by *Hae III* endonuclease. Frequencies of the A allele were 0.40, 0.33, 0.37 and 0.51 for Holstein, Nelore, Gir and Caracu breeds respectively. For this locus, the Holstein breed was the only one in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium.

Genetic distance among Holstein, Nelore, Gir and Caracu was obtained using the Euclidean average distance (EAD), and the clusters were made by the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) method.

The dendrograms for EAD were obtained using the frequencies just for kappa-casein locus, just for β -lactoglobulin locus and for both together. The kappa-casein locus gave the best dendrogram, with two clusters, one with Nelore and Gir breeds (EAD = 0.0142) and another one with Holstein and Caracu (EAD = 0.0917). The EAD between these groups was 0.1645. The β -lactoglobulin locus did not showed a good dendrogram, because for this locus the breeds were not grouped in accordance to their species.

The EAD calculated from the kappa-casein genetic frequencies divided the different breeds in accordance with their species, but probably it is not a good index for the production ability. This observation is based on the fact that Holstein breed, specialized in milk production, had kappa-casein allele frequencies very similar to breeds specialized in beef production.

1- INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, animais, plantas e microorganismos vem sendo selecionados através de características fenotípicas ligadas a produtividade. Em bovinos a seleção sempre procurou manter no rebanho os melhores animais, o que resultou em uma melhora substancial no potencial genético ao longo do tempo, principalmente quando os testes de progênie e provas de ganho de peso vieram auxiliar os melhoristas.

Pesquisadores, trabalhando com biologia molecular, tem desenvolvido novas técnicas para determinação de polimorfismo genético, sendo a técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) uma das mais utilizadas. Esta técnica permite a produção de milhares de cópias de um segmento de DNA, que pode ser analisado com o uso de enzimas de restrição, para a identificação de diferentes alelos. Em bovinos esta metodologia está sendo empregada através do uso de marcadores moleculares, para estudar genes que afetam composição corporal, ganho de peso e produção de leite (DeNISE et al ,1993).

Entre os marcadores associados a produção de leite, destacam-se, devido a sua influência sobre características que afetam a qualidade do leite, os genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina. A kappa-caseína tem duas formas principais identificadas, conhecidas como alelo **A** e alelo **B**. Este gene está relacionado com a porcentagem de proteína no leite e com o rendimento na produção de queijo, sendo o alelo **B** favorável para ambas as características. A β -lactoglobulina também tem como alelos principais os alelos **A** e **B** e está relacionada a porcentagem de gordura e a quantidade de caseína presente no leite,

sendo que o alelo **B** desta proteína também é favorável (SABOUR et al, 1993; EENENNAAM; MEDRANO, 1991).

A kappa-caseína e a β -lactoglobulina, tem sido utilizadas, para prever características de lactação em gado leiteiro e com isso possibilitar uma seleção precoce dos animais. Os produtores, ao selecionarem touros com resultados semelhantes em testes de progênie, devem considerar os genótipos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em sua escolha como um critério adicional (SABOUR et al, 1993). Os mesmos marcadores, tem sido utilizados em bovinos de corte, para avaliar a produção de leite destes animais que é um importante componente da habilidade materna. Ainda não é conhecida a influência das variantes genéticas nas características de produção de leite em bovinos de corte, nem tampouco sua influência sobre a habilidade materna.

A seleção baseada nas diferentes variáveis genéticas, depende do conhecimento das frequências destas variantes nas populações de interesse. No Brasil, pouco se sabe sobre as frequências dos genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina nas populações de interesse, e sobre as diferenças genéticas existentes entre estas populações. Dessa forma, o presente trabalho, teve por objetivo a identificação e quantificação das frequências dos alelos **A** e **B** dos genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina nas raças Holandesa, Gir, Caracu e Nelore e a caracterização destas populações com base nos dois locos estudados.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Aspectos Gerais das Raças Holandesa, Nelore, Gir e Caracu

Os bovinos são classificados como mamíferos da ordem *Artiodactylis*, família *Bovidae* e tribo *Bovini*. O gênero *Bos* Linnaeus é um dos quatro gêneros existentes na tribo *Bovini*, e deu origem a todas as raças bovinas conhecidas atualmente (NOWAK; PARADISO, 1983). No subgênero *Bos* podem se distinguir dois grupos, o das raças européias sem cupim, conhecido por *Bos taurus* e outro que engloba todas as raças indianas conhecido por *Bos indicus*.

2.1.1- Raça Holandesa

A raça Holandesa pertence a espécie *Bos taurus* e teve sua origem na região dos Países Baixos onde há 2.000 anos atrás bovinos domesticados já podiam ser encontrados. Os bovinos existentes naquela região formavam uma população bastante heterogênea a partir da qual a raça Holandesa foi formada (SANTIAGO, 1975).

O Herd-Book da raça Holandesa foi estabelecido em 1873 (TORRES & JARDIM, 1975) e o melhoramento destes animais começou a ser realizado muito cedo. Em 1916, já eram realizados testes de progênie pela Sociedade dos Países Baixos em animais da raça Holandesa, sendo que estas atividades foram ainda mais intensificadas após a segunda guerra mundial (SANTIAGO, 1975).

A capacidade de produção leiteira e adaptação dos animais da raça Holandesa, fez com que estes rapidamente se espalhassem pelo mundo. Em Israel, país de clima quente e seco, a produção leiteira em rebanhos da raça Holandesa chegava a 6.000 Kg por lactação, com cerca de 200 Kg de gordura já na década de 70 (SANTIAGO, 1975), sendo que em 1994 a média de produção da raça Holandesa neste país já estava por volta de 9.000 Kg de leite e 300 Kg de gordura (RON et al, 1994). No Brasil, a entrada em grande escala de bovinos da raça Holandesa, ocorreu apenas neste século, com especial ênfase na região centro-sul do país.

As vacas da raça Holandesa iniciam sua vida reprodutiva precocemente, tendo sua primeira cria por volta dos 27 meses de idade. Em alguns casos a transferência de animais de regiões temperadas para os trópicos pode retardar a idade à primeira cria (CAMPOS et al, 1981). O intervalo entre partos nesta raça costuma ser pequeno, por volta dos 12 meses, e em comparação com raças zebuínas a raça Holandesa possui estro mais prolongado com sinais mais evidentes, facilitando a prática da inseminação artificial (BENINTENDI et al, 1988).

Com exceção do melhoramento genético praticado em aves, a produção de leite é a característica de produção animal que mais vem recebendo atenção por parte dos melhoristas, obtendo resultados bastante expressivos (LASLEY, 1987). A criação de centrais de registro para dados de produção tem auxiliado o planejamento do melhoramento, uma vez que os dados coletados pelas centrais tornam possível o reconhecimento de vacas e touros com alto potencial genético para a produção de leite (LASLEY, 1987). Através de técnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões, os germoplasmas de interesse na raça Holandesa são largamente distribuídos dentro dos países e ao redor do mundo.

2.1.2- Raça Nelore e Raça Gir

O Brasil constitui depois da Índia, o mais importante centro de criação e seleção de raças zebuínas, sendo que dentre estas as raças Nelore e Gir são as mais encontradas no país (SANTIAGO, 1975).

As raças zebuínas estão incluídas na espécie *Bos indicus* e de forma geral iniciam sua vida reprodutiva mais tarde do que raças européias. MARTINEZ; SANTIAGO, (1992) em um estudo realizado com animais da raça Nelore observaram que 9% das vacas pariram pela primeira vez com mais de 48 meses de idade e 76% das vacas iniciaram a vida reprodutiva com cerca de 42 meses de idade. Em um estudo realizado com animais da raça Gir, CAMPOS et al (1981), obtiveram uma média de 41,1 meses para a idade a primeira parição dos animais.

Com relação ao intervalo entre partos nas raças zebuínas, MARTINEZ; SANTIAGO (1992) observaram que 64,4% dos animais apresentaram um intervalo entre partos com média de 12 meses e que cerca de 20% dos animais apresentaram intervalos com mais de 16 meses. Em zebuínos, o estro tem duração mais curta, e as vacas não exibem evidências claras deste período do ciclo como ocorre com a raça Holandesa (BENINTENDI et al, 1988).

A evolução das raças zebuínas no passado foi bastante lenta, sendo que a seleção era feita de acordo com as opiniões e preferências particulares dos criadores. Este problema na raça Gir foi ainda mais grave, já que durante muito tempo esta raça foi selecionada tendo-se em vista uma preocupação excessiva com as características étnicas, principalmente formação de cabeça e pelagem, esquecendo-se da verdadeira finalidade da criação de bovinos que é sua capacidade de produção (SANTIAGO, 1975). Apenas nos últimos 40 anos planos de seleção e melhoramento foram estabelecidos o que acarretou em uma rápida expansão e melhoramento principalmente da raça Nelore.

As raças zebuínas no Brasil são voltadas basicamente para a produção de carne, ao contrário do que ocorre na Índia, seu país de origem, aonde estas raças são destinadas a produção leiteira e a tração animal. Na Índia o gado Nelore é dócil e rebanhos bem

cuidados produzem em média 1600Kg de leite por lactação, tendo este leite 5% de gordura (PHILLIPS, 1954).

No Brasil a raça Nelore utilizada para a produção de carne, tem a seu favor uma boa conformação, bom desenvolvimento e habilidade para o aproveitamento das forragens (SANTIAGO, 1975). A raça Gir quando destinada a produção de carne possui características menos favoráveis do que a raça Nelore tendo um desenvolvimento bem mais lento, porém com boa qualidade de carcaça.

Na década de 50, acreditou-se que a seleção da raça Gir para a produção leiteira poderia solucionar os problemas de produção de leite nos trópicos. Em 1960, iniciou-se a formação de um rebanho Gir destinado a produção leiteira na unidade do Instituto de Zootecnia (IZ) em Ribeirão Preto, partindo-se para isto de 50 vacas Gir de boa produção de leite. O touro Xoporó, cedido pela Estação Experimental Getúlio Vargas em Uberaba, Minas Gerais foi utilizado intensamente na formação deste rebanho, sendo que apenas em 1976 a inseminação artificial começou a ser utilizada (BENINTENDI et al, 1988).

A média da produção leiteira no rebanho do IZ de Ribeirão Preto até 1986 estava por volta de 1814 Kg de leite em lactações de 283 dias em média (BENINTENDI et al, 1988). Neste rebanho, a posição de se utilizar a raça Gir como uma solução para os problemas na produção de leite foi sendo modificada, e hoje acredita-se, que esta raça é mais importante para a produção leiteira quando utilizada em cruzamentos com raças leiteiras européias.

2.1.3- Raça Caracu

O gado Caracu descende de bovinos portugueses, portanto da *espécie Bos taurus*, trazidos para o país no tempo do Brasil colônia. A primeira entrada de bovinos documentada no Brasil ocorreu na Bahia em 1550, com animais vindos da ilha de Cabo Verde (MALDONADO, 1917). O gado de origem portuguesa espalhou-se pelo país, tornando-se a base para a seleção de alguns tipos regionais como o Junqueiro, o

Franqueiro, o Pedreiro, o Pantaneiro, entre outros. DOMINGUES (1961) reconhece entre estes tipos duas raças nativas naturais : a Curraleira e a Malabar (resultante de cruzamentos entre taurinas e zebuínas), e duas raças nativas melhoradas: Caracu e Mocha Nacional. A raça Caracu é considerada a raça bovina nacional mais bem adaptada ao solo e estilo de criação no Brasil (TORRES & JARDIM, 1975).

A princípio os animais da raça Caracu estavam localizados entre o rio Pardo e o rio Mogi, nos estados de São Paulo e Minas Gerais até que em 1908, o governo de São Paulo iniciou o Posto de Seleção do Gado Caracu em Nova Odessa, adquirindo 16 vacas e 2 touros e visando o melhoramento da raça (TORRES & JARDIM, 1975). A Associação Herd-Book Caracu, foi criada em 1916, quando as criações encontravam-se principalmente nas regiões de Ribeirão Preto, São Carlos, Poços de Caldas e Piracicaba, existindo porém alguns rebanhos em Mato Grosso e no Paraná.

Inicialmente o Caracu foi considerado como um animal destinado a produção de carne, porém hoje é considerado um animal de dupla aptidão, sendo eficiente para produção de carne e de leite. Alguns rebanhos formados por vacas de acentuada produção leiteira chegam a produzir 2000 Kg de leite em uma lactação não sendo raras vacas que durante alguns meses dão 10 Kg de leite por dia. Para a produção de carne, animais da raça Caracu sob condições de confinamento podem atingir 461 Kg aos 789 dias de idade (idade de abate), sendo que o rendimento de carcaça nesta raça está por volta de 57 a 60% (LIMA et al, 1992).

Os animais da raça Caracu iniciam sua vida reprodutiva um pouco mais tarde do que animais da raça Holandesa. PEREIRA (1992) trabalhando com Caracu Caldeano, obteve uma média de 37 meses para a idade a primeira parição destes animais, sendo que neste mesmo estudo a média obtida para o intervalo entre partos foi de 14 meses. Os animais da raça Caracu são extremamente rústicos e resistentes a doenças, características que mostram ser interessante o uso da raça Caracu em pastagens de valor nutritivo inferior (TORRES & JARDIM, 1975).

2.2- Proteínas do Leite

As proteínas presentes no leite podem ser divididas em duas classes: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas correspondem à aproximadamente 80% da proteína total do leite em bovinos, sendo esta classe subdividida em kappa-caseína, α s1-caseína, α s2-caseína e β -caseína. As principais proteínas do soro são a α - lactoalbumina, β -lactoglobulina e imunoglobulinas (GROENEN; POEL, 1994).

A composição do leite de uma determinada espécie, sofre pouca variação durante o período de lactação, com exceção dos primeiros dias após o parto quando o leite é chamado de colostro e em bovinos pode conter de 150 a 250 gramas de proteína por litro de leite, sendo que 50 a 60% destas proteínas são imunoglobulinas. O leite maduro possui apenas 2% do total de proteínas formado por imunoglobulinas (McMEEKIN, 1970).

2.2.1-Caseínas

A caseína está presente no leite na forma de um complexo coloidal que contém cálcio e fósforo, sendo aproximadamente 7% da sua composição formada por material inorgânico (RAMSDELL; WHITTIER, 1944). Durante muito tempo, a fração caseína do leite foi considerada como uma proteína pura sendo que uma das primeiras observações da heterogeneidade da caseína foi feita por OSBORNE; WAKEMAN (1918). Hoje sabe-se que a caseína presente em bovinos está dividida em quatro grandes famílias: β , α s1, α s2 e κ - caseínas (FLORES; RICHARDSON, 1988).

A distribuição de amino-ácidos polares e apolares entre cada caseína tende a ser assimétrica, gerando moléculas de proteína com características hidrofóbicas e hidrofílicas, conferindo as caseínas excelentes propriedades funcionais como emulsificantes (SWAISGOOD, 1982). Os grupos seril fosfato das caseínas β , α s1, α s2 associados a complexos de cálcio fosfatado no leite formam agregados frouxos chamados de micelos

de caseína e podem ter de 20 até 600 nm de diâmetro. Estes agregados são estabilizados por uma cobertura de kappa-caseína formando uma suspensão coloidal. Estas estruturas tem o papel de maximizar a quantidade de cálcio fosfatado e proteína disponível em um volume limitado, promovendo uma nutrição adequada ao recém-nascido (SCHMIDT, 1982).

A kappa-caseína é responsável pela estabilidade dos micelos de caseína. Esta proteína constitui aproximadamente 12% da caseína total do leite e é considerada uma fosfoglicoproteína (NG-KWAI-HANG et al, 1991). Como todas as caseínas, a kappa-caseína possui alta quantidade de prolina (8,8%), mas diferentemente das outras possui também quantidade significativa de cistina (1,4%). O monômero funcional da kappa-caseína tem peso molecular de 17.000 a 20.000 daltons e forma uma proteína que contém 169 amino-ácidos (MACKINLAY ; WAKE, 1970).

A kappa-caseína forma uma camada na superfície dos micelos de caseína e, sendo pouco sensível ao cálcio ao contrário das outras caseínas, garante a estabilidade dos micelos. SULLIVAN et al (1959), descobriram que a quantidade de kappa-caseína presente nos micelos de caseína de tamanho reduzido era maior do que nos grandes micelos e verificaram que o conteúdo de kappa-caseína é inversamente proporcional ao logaritmo do diâmetro dos micelos de caseína. Isto veio confirmar que a kappa-caseína está realmente presente na superfície dos micelos, já que a superfície específica dos micelos de tamanho reduzido é maior do que dos grandes micelos.

A estabilidade física dos micelos de caseína é importante para definir as características dos produtos lácteos. A ausência de cálcio no meio torna as soluções de caseína claras, enquanto a adição de pequenas concentrações de cálcio as torna opacas devido a formação dos micelos que ficam em suspensão (MACKINLAY & WAKE, 1970). Além da ausência de cálcio, a enzima renina também é capaz de romper os micelos de caseína, uma vez que destrói a camada superficial destes constituída por kappa-caseína.

A ação da renina sobre a kappa-caseína constitui a primeira fase do processo de coagulação do leite. Nesta fase a renina ataca a kappa-caseína especificamente na ligação

entre os amino-ácidos das posições 105 e 106 quebrando a cadeia de polipeptídeos e originando duas novas cadeias de peptídeos: uma do amino-ácido 106 até o 169, chamada de glicomacropeptídeo que é hidrofílica, solúvel e se desprende do micelo de caseína, e outra cadeia do amino-ácido 1 ao 105, chamada de para-kappa-caseína que é fortemente hidrofóbica e continua presa no micelo. Esta reação altera as propriedades físicas dos micelos de caseína, que passam a formar agregados na segunda fase da coagulação e então o coágulo propriamente dito na terceira fase quando ocorre a expulsão de água dos agregados (FOX, 1982).

Uma vez que a coagulação do leite é um processo necessário na produção de queijo, e que as caseínas são as únicas proteínas passíveis de sofrer coagulação no leite, o rendimento e a qualidade do queijo dependem principalmente da quantidade e da variável genética de caseína presente no leite (LIN et al, 1992).

A kappa-caseína possui duas variantes genéticas principais denominadas de alelos **A** e **B**. A banda da proteína codificada pelo alelo **A** se move mais rapidamente em eletroforese alcalina com mercaptoetanol e uréia em relação a banda do alelo **B** (SWAISGOOD, 1975), o que foi observado em todos os rebanhos da raça Holandesa estudados (NEELIN, 1964).

A proteína codificada pelo alelo **B**, possui uma isoleucina na posição 136 e uma alanina na posição 148, enquanto a proteína codificada pelo alelo **A**, possui uma treonina e um ácido aspártico nestas posições, respectivamente (NG-KWAI-HANG, 1991).

Nos rebanhos da raça Holandesa nos Estados Unidos existe uma predominância na frequência do alelo **A** sobre o alelo **B** da kappa-caseína. Tem sido demonstrado porém que a kappa-caseína **B** é favorável em relação a kappa-caseína **A** porque está associada a um teor de caseína mais alto no leite e a um rendimento superior na produção de queijo (NG-KWAI-HANG et al, 1987; MARZIALI; NG-KWAI-HANG, 1986).

2.2.2- Proteínas do Soro

As proteínas do soro estão divididas em duas classes: a fração albumina e a fração globulina. A fração albumina é solúvel em uma solução de sulfato de amônia 50% e representa 9,1% da proteína total do leite, enquanto a fração globulina é insolúvel nestas condições representando 3,1% da proteína total (JENNESS, 1971).

As proteínas da fração globulina são também conhecidas por imunoglobulinas e representam um grupo bastante heterogêneo que é dividido em três grandes classes: G, M e A (IgG, IgM e IgA). A maioria das proteínas deste grupo não é sintetizada na glândula mamária e sim em diversas partes do organismo da fêmea em resposta a antígenos, sendo então transferidas ao leite pela corrente sanguínea (JENNESS, 1971).

A fração globulina do leite, assim como a fração globulina do sangue, é importante fonte de imunidade para o organismo. Isso pode ser evidenciado pela quantidade destas proteínas que aparecem no colostro, e que passam através das paredes do trato alimentar do recém-nascido até a corrente sanguínea sem sofrer modificação durante os três primeiros dias de vida (McMEEKIN, 1970).

Os principais componentes da fração albumina são a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, sendo que esta última representa cerca de 75% das albuminas totais na raça Holandesa (LARSON; GILLESPIE, 1957). É interessante citar que não há evidência da presença de β -lactoglobulina em leite humano (BELL; McKENZIE, 1964).

Em 1966, foi descoberto que a proteína α -lactoalbumina desempenha importante papel na síntese da lactose já que é um dos componentes da enzima responsável por catalisar a formação da lactose a partir da uridina difosfato galactose e da glicose, enquanto a β -lactoglobulina parece não ter outra função que não seja a nutricional como fonte de amino-ácidos (JENNESS, 1971).

O monômero da β -lactoglobulina possui peso molecular de 18.000 daltons. Ao contrário das caseínas a β -lactoglobulina é uma proteína globular de estrutura complexa (FLORES; RICHARDSON, 1988). A molécula de β -lactoglobulina possui 162 amino-

ácidos e tem como variáveis principais a β -lactoglobulina **A** e a β -lactoglobulina **B**, cada uma codificada por um alelo específico (alelo **A** e alelo **B**). A proteína codificada pelo alelo **A** contém um resíduo de aspargina na posição 64 e um resíduo de valina na posição 118, enquanto a proteína proveniente do alelo **B** possui um resíduo de glicina e um de alanina nestas posições respectivamente (MEDRANO; CORDOVA, 1990b).

A β -lactoglobulina mostrou ter uma relação importante com a kappa-caseína: o leite que contém micelos de caseína pequenos com maior concentração de kappa-caseína na superfície é mais estável ao calor na presença de β -lactoglobulina do que o leite que contém micelos maiores (FOX, 1982). O loco de β -lactoglobulina parece ainda estar relacionado a porcentagem de gordura do leite e a porcentagem de caseína presente no leite (LIN et al, 1992), sendo que a β -lactoglobulina **B** está relacionada a uma maior produção de leite e melhores características para a produção de queijo (NG-KWAI-HANG et al, 1987).

Em um trabalho recente a concentração sérica de β -lactoglobulina na 26ª semana de gestação foi utilizada para prever a produção de leite de novilhas. As análises mostraram uma correlação positiva entre produção de leite, gordura e proteína com a concentração de β -lactoglobulina, mostrando que uma simples amostra de sangue pode ser usada como marcador fisiológico para o potencial de produção de leite (MAO; BREMEL, 1995).

2.3- Polimorfismo Genético das Proteínas do Leite

Cada uma das proteínas do leite é determinada por um único loco cujas variantes genéticas não são afetadas pelas características de ambiente. Os alelos de cada loco são codominantes e a segregação ocorre de acordo com as leis de Mendel (LIN et al, 1992).

Os dois principais alelos encontrados em α s1-caseína são os alelos **B** e **C** sendo que se conhece a existência também dos alelos **A** e **D** que aparecem em frequência muito

baixa (THOMPSON, 1970). Para β -caseína os alelos encontrados são **A1**, **A2**, **A3** e **B** sendo que os alelos **A1**, **A2** e **A3** só puderam ser diferenciados por eletroforese ácida (pH 3,0) (EENENNAAM; MEDRANO, 1991). A kappa-caseína e a β -lactoglobulina tem como alelos principais o **A** e o **B**, sendo que para a kappa-caseína também foram identificados os alelos **C** e **E** que aparecem em frequências muito baixas (MIRANDA et al, 1993).

Algumas variantes das proteínas do leite são universais, enquanto outras são restritas a certos rebanhos ou raças. Por exemplo, no caso da α s1-caseína, a raça Ayrshire possui apenas o alelo **B** enquanto as raças Jersey e Guernsey possuem os alelos **B** e **C** e a raça Holandesa os alelos **A**, **B** e **C**. O alelo **B** da α -lactoalbumina está presente em todas as raças, exceto em gado zebuino (ASCHAFFENBURG, 1968).

Os genes que codificam as principais proteínas do leite tem sido estudados em várias espécies e em algumas estes genes foram sequenciados. Em bovinos, os gene da α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína β -lactoalbumina e β -lactoglobulina foram totalmente sequenciados, enquanto o gene de kappa-caseína foi sequenciado apenas parcialmente (GROENEN; POEL, 1994). O sequenciamento da α s1-caseína, α s2-caseína e β -caseína parece indicar uma forte evidência de que estes genes são provenientes de um gene ancestral comum (BONSING; MACKINLAY, 1987). Nestes genes a sequência codificadora para o peptídeo principal assim como a região promotora são altamente conservadas.

Os quatro genes de caseína bovina estão localizados em um fragmento de 200.000 pares de bases no cromossomo 6 na seguinte ordem: α s1-caseína, β -caseína, α s2-caseína e kappa-caseína (GROENEN; POEL, 1994). Uma forte ligação genética entre os genes foi encontrada por simples análise de células de esperma (LIEN et al, 1992). Não há ligação genética entre os locos de caseína e o loco de β -lactoglobulina (EENENNAAM; MEDRANO, 1991).

Devido a ligação dos locos de caseína, todas as possíveis combinações genotípicas não são encontradas nas mesmas proporções na população. Na raça Holandesa o

genótipo mais comum é **BB A1A2 AA** para α s1-caseína, β -caseína e kappa-caseína respectivamente, enquanto o genótipo **BB A1B AB** é o menos encontrado (EENENNAAM; MEDRANO, 1991; ALEANDRI et al, 1990; McLEAN et al, 1984).

A ligação gênica é o primeiro fator importante a afetar a seleção, já que com a ligação a segregação dos possíveis haplotipos existentes não ocorre na mesma proporção, causando um desequilíbrio de ligação. Quanto maior o número de locos ligados, mais lenta é a aproximação do equilíbrio, e essa aproximação é ainda mais lenta quanto mais próximos estiverem os locos (FALCONER, 1987). Um outro fator que afeta a seleção é a frequência alélica, de forma que se um dos alelos desejado é raro na população, a seleção se torna restrita já que um número pequeno de descendentes irá herdar esse alelo a cada geração (FALCONER, 1987).

A raça Holandesa é a mais estudada e mostra pouca variação nas frequências dos alelos **A** e **B** do gene de kappa-caseína mesmo em estudos realizados em diferentes países. RON et al (1994) estudando animais da raça Holandesa em Israel encontraram uma frequência de 0,89 para o alelo **A** e 0,11 para o alelo **B**, SABOUR et al (1993) em Quebec encontraram valores de 0,80 para o alelo **A** e 0,20 para o alelo **B**, EENENNAAM; MEDRANO (1991) na Califórnia encontraram frequências de 0,82 para o alelo **A** e 0,18 para o alelo **B**. No Brasil um estudo realizado em Minas Gerais com bovinos da raça Holandesa mostrou uma frequência gênica de 0,80 para o alelo **A** e 0,20 para o alelo **B** (RODRIGUES et al, 1994).

A β -lactoglobulina mostrou resultados um pouco mais variáveis na raça Holandesa. No Canada, NG-KWAI-HANG et al (1991) encontraram frequências de 0,35 para o alelo **A** e 0,65 para o alelo **B** do gene de β -lactoglobulina, resultados semelhantes aos encontrados por SABOUR et al (1993) na mesma região. Nos Estados Unidos EENENNAAM; MEDRANO (1991) encontraram uma frequência de 0,43 para o alelo **A** e 0,57 para o **B**. RON et al (1994) em Israel obtiveram valores de 0,52 e 0,48 para os alelos **A** e **B** de β -lactoglobulina respectivamente.

Na raça Jersey, estudos mostraram que as frequências dos alelos **A** e **B** para kappa-caseína tendem a ser invertidas em relação a raça Holandesa. KIDDY et al (1964) encontrou valores de 0,30 e 0,70 para as frequências dos alelos **A** e **B** respectivamente, enquanto LI; GAUNT (1972) e HINES et al. (1977) obtiveram frequências de 0,38 para o alelo **A** e 0,62 para o alelo **B**. Para a raça Jersey os valores das frequências dos alelos de β -lactoglobulina encontrados nos Estados Unidos foram para o alelo **A** 0,41; 0,36 e 0,37 e para o alelo **B** 0,59; 0,64 e 0,63 em estudos realizados respectivamente por KIDDY et al (1964); LI; GAUNT (1972) e EENENNAAM; MEDRANO (1991).

Em um trabalho realizado no Canadá com a raça Ayrshire, SABOUR et al (1993) encontraram uma frequência de 0,22 para o alelo **B** de kappa-caseína em touros destinados a inseminação artificial, sendo que destes touros todos aqueles com 10 ou mais filhos tinham genótipo **AA** para kappa-caseína. Para o loco de β -lactoglobulina a frequência do alelo **B** neste trabalho foi de 0,59, mais baixa do que a encontrada por LIN et al (1986) que foi de 0,84.

A frequência do alelo **B** para kappa-caseína em touros da raça Holandesa é baixa em comparação à frequência encontrada em outras raças de origem européia. Na raça Ayrshire a frequência deste alelo é cerca de 1/3 maior do que na raça Holandesa e na raça Jersey chega a ser sete vezes maior. Observou-se que a frequência do alelo **B** nos touros na raça Holandesa é menor do que nas vacas, porém semelhante a frequência observada em vacas de alto valor genético usadas como doadoras de embriões (SABOUR et al, 1993).

2.3.1- Detecção do Polimorfismo Genético

A única forma de determinação do polimorfismo genético das proteínas do leite até pouco tempo era através de amostras de leite. A caseína era separada do restante do leite por precipitação isoeletrica e as diferentes proteínas e suas variantes separadas por

eletroforese em gel de poliacrilamida (EENENNAM; MEDRANO,1991; NG-KWAI-HANG et al, 1984; NG-KWAI-HANG et al, 1987). Como a mobilidade das variantes de uma mesma proteína é diferente, a presença ou ausência de determinadas bandas indica o genótipo do animal. Dessa forma somente podiam ser genotipadas fêmeas em lactação.

A primeira identificação do genótipo de kappa-caseína através de amostras de sangue aconteceu em 1990, quando foram publicados dois trabalhos que utilizaram a reação em cadeia da polimerase, capaz de multiplicar a quantidade de material genético inicial, para identificação do genótipo de kappa-caseína. MEDRANO; CORDOVA (1990a) amplificaram uma sequência de 350 pares de bases e utilizando a enzima de restrição *Hinf I* puderam identificar os alelos **A** e **B** da kappa-caseína. ZADWORNÝ; ZUHNLEIN (1990) amplificaram uma região de 99 pares de bases e digeriram o produto da amplificação com as enzimas *Taq I* e *Mbo II* identificando assim os alelos **A** e **B** da kappa-caseína. Esta nova técnica tornou possível a identificação do genótipo de touros e de fêmeas ainda jovens (RON et al, 1994; SABOUR et al, 1993).

Também em 1990 foi realizada a primeira detecção de genótipo de β -lactoglobulina através da técnica de PCR. MEDRANO; CORDOVA (1990b) amplificaram uma sequência de 247 pares de bases no gene de β -lactoglobulina a partir de material genético extraído de amostras de sangue e realizaram digestão com a enzima de restrição *Hae III* identificando os alelos **A** e **B** do gene de β -lactoglobulina.

Mais tarde a qualidade da amplificação de β -lactoglobulina foi melhorada com o desenvolvimento de novos primers que amplificam uma sequência de 262 pares de bases no gene da β -lactoglobulina (MEDRANO, comunicação pessoal).

2.3.2- Polimorfismo Associado a Características de Produção

A importância do polimorfismo genético das proteínas do leite bovino nas propriedades de manufatura de queijo e características de produção de leite, gordura e

proteína tem sido investigadas por alguns autores (MARZIALI; NG-KWAI-HANG, 1986; LIN et al, 1986; SCHAAR, 1984). As variantes genéticas **A** e **B** da kappa-caseína são associadas com o conteúdo de proteína no leite e tem uma influência significativa no tempo de coagulação do leite, firmeza do coágulo e rendimento na produção de queijo sendo que existe uma superioridade dos animais de genótipo **BB** em relação a animais **AA**. Devido a este fato, tem sido proposto o aumento da frequência do alelo **B** nos rebanhos através de programas de cruzamento que utilizem touros com genótipo favorável para kappa-caseína (**BB**, **AB**) (MARZIALI ; NG-KWAI-HANG, 1986).

A β -lactoglobulina também parece desempenhar importante papel nas características de produção de queijo, estando ainda associada a produção de gordura no leite (RON et al, 1994), sendo que para esta proteína o alelo **B** também tem se mostrado favorável.

Para a produção de queijo a relação entre a kappa-caseína e a β -lactoglobulina parece ser mais importante do que o efeito das duas proteínas considerado separadamente. O leite com alta relação β -lactoglobulina : kappa-caseína possui um pico máximo de estabilidade térmica menor do que o leite com relação β -lactoglobulina : kappa-caseína mais baixa, sendo este último melhor para coagulação e produção de queijo (FLORES; RICHARDSON, 1988).

A relação entre as duas proteínas também é demonstrada com o fato de que as variantes de β -lactoglobulina influenciam na quantidade de caseína presente no leite, sendo que a β -lactoglobulina **B** está associada a uma maior concentração de kappa-caseína (BOVENHUIS et al, 1992). MARZIALI; NG-KWAI-HANG (1986) utilizando condições de laboratório para a produção de queijo encontraram um aumento de 1,59% na eficiência de produção de queijo Cheddar para cada aumento de 1% na quantidade de caseína presente no leite. Na produção de queijo parmesão EENENNAM; MEDRANO (1991) encontraram um aumento de 9% na matéria seca de queijo produzido com leite de animais **BB** para β -lactoglobulina em relação a animais **AA**.

Dentre as características de produção de leite, proteína e gordura, a produção de proteína parece ser o fator mais afetado pelo genótipo de kappa-caseína. EENENNAAM; MEDRANO (1991) encontraram uma produção de proteína no leite de 3,64% para animais da raça Holandesa de genótipo **BB** e 3,578% para animais de genótipo **AA**, sendo esta diferença significativa ($P<0,10$). NG-KWAI-HANG et al (1991), observando a influência dos genótipos das proteínas do leite durante três lactações de vacas da raça Holandesa sobre dados de produção encontraram influência significativa do genótipo de kappa-caseína sobre a produção de proteína em todas as lactações, sendo que os animais de genótipo **BB** tiveram uma produção 0,08; 0,06 e 0,04% superior aos animais de genótipo **AA** na primeira, segunda ($P<0,01$) e terceira ($P<0,05$) lactações respectivamente. BOVENHUIS et al (1992) estudando a primeira lactação de vacas da raça Holandesa encontraram diferenças significativas ($P<0,001$) na produção de proteína em relação aos genótipos de kappa-caseína sendo que os animais **BB** produziram 0,08% mais proteína do que os animais **AA**. NG-KWAI-HANG et al (1984) observaram que os animais de genótipo **BB** para kappa-caseína produziram 0,13% mais proteína no leite do que animais de genótipo **AA** ($P<0,05$).

A β -lactoglobulina mostra maior influência sobre a produção de gordura no leite. NG-KWAI-HANG et al (1984) encontraram uma produção de gordura 0,04% ($P<0,01$) maior em animais de genótipo **BB** comparados a animais de genótipo **AA** para β -lactoglobulina. BOVENHUIS et al (1992) observaram diferença significativa ($P<0,01$) na produção de gordura no leite de animais da raça Holandesa de primeira lactação devido ao polimorfismo do loco de β -lactoglobulina sendo que animais **BB** produziram 0,12% mais gordura do que animais **AA**.

Quanto a influência dos genótipos de kappa-caseína e β -lactoglobulina sobre a quantidade de leite produzida, os diferentes estudos nem sempre obtiveram resultados semelhantes. EENENNAAM; MEDRANO (1991) obtiveram um aumento significativo ($P<0,10$) na produção de leite de animais de genótipo **BB** em relação a animais **AA** para o loco de kappa-caseína (+ 296 Kg) sendo que o genótipo de β -lactoglobulina não

mostrou influência significativa sobre a quantidade de leite produzida. BOVENHUIS et al (1992) não obtiveram resultados significativos dos genótipos de kappa-caseína sobre a quantidade de leite produzida por animais da raça Holandesa de primeira lactação, porém encontraram um aumento de produção significativo ($P < 0,003$) de animais de genótipo **AA** para β -lactoglobulina em relação a animais **BB** sendo que o genótipo **AA** produziu 100 Kg de leite a mais do que o genótipo **BB**.

Com relação a interação entre os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina sobre características de produção RON et al (1994) encontraram um efeito significativo ($P < 0,01$) desta interação apenas sobre a produção de gordura no leite sendo que animais de genótipo **BB** para β -lactoglobulina e **AB** para kappa-caseína produziram 6,21% a mais de gordura no leite do que animais **AA AA** para os dois loco. Neste estudo não foi encontrado nenhum animal de genótipo **BB BB**.

2.4- Marcadores Moleculares

O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão, já que estes marcadores independem das influências de ambiente, e podem ser utilizados precocemente inclusive na fase embrionária (COUTINHO; REGITANO, 1995).

Os marcadores moleculares de DNA podem ser anônimos, ou seja, não serem relacionados a nenhum gene conhecido, ou ainda podem ser genes candidatos a influenciar características quantitativas (DeNISE et al 1993). Os marcadores anônimos, principalmente microssatélites, são de grande importância para a construção de mapas genômicos, pois estão espaçados ao longo do genoma e possuem alto polimorfismo (DeNISE et al, 1993).

Os genes candidatos, são genes selecionados devido a sua já conhecida importância para a característica que se pretende estudar (COUTINHO; REGITANO,

1995). Esta classe de marcadores moleculares tem sido muito utilizada na área animal para a detecção de genótipos superiores assim como para a detecção de doenças.

Para prever características de produção de leite em gado leiteiro, alguns marcadores moleculares tem sido estudados, como os genes responsáveis pela produção de proteína no leite (NG-KWAI-HANG et al, 1984; LIN et al, 1986; WELLER; SOLLER, 1990) e genes ligados a produção de hormônios, como o hormônio do crescimento e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) (COWAN et al, 1992).

Técnicas de biologia molecular como a técnica de PCR estão facilitando o estudo dos marcadores moleculares, fazendo com que a construção de mapas genômicos e a detecção de genes ligados a características de produção em determinadas espécies como bovinos, suínos e aves seja ainda mais rápida.

2.5- Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase, mais conhecida como técnica de PCR, foi formulada em 1983 e apresentada a comunidade científica em 1984, porém naquela época muito pouca importância foi dada a esta nova metodologia (MULLIS, 1990).

Esta técnica permite que a partir de uma única molécula de DNA, sejam geradas cerca de 100 bilhões de moléculas similares em apenas algumas horas, sendo que para isto são necessários um tubo teste, alguns reagentes e uma fonte de calor (MULLIS, 1990). A amplificação de uma sequência de DNA específica é baseada no uso de dois oligonucleotídeos chamados de iniciadores. Estes, flanqueiam o fragmento a ser amplificado, e sofrem hibridização com as sequências de DNA complementares a eles (ERLICH, 1988). A especificidade da sequência de DNA a ser amplificada é derivada da informação sobre as sequências nucleotídicas que limitam o fragmento a ser amplificado.

Com esta informação pares de iniciadores são construídos contendo sequências complementares a uma das terminações da fita de DNA.

A reação de PCR envolve ciclos repetidos de desnaturação das fitas duplas de DNA através do uso de calor; anelamento dos iniciadores complementares e finalmente extensão dos iniciadores anelados pela enzima DNA polimerase (ERLICH, 1988). A cada ciclo de amplificação o número de fragmentos de DNA dobra, o que resulta em um acúmulo exponencial destes fragmentos em aproximadamente 2^n , aonde “n” é o número de ciclos (SAIKI, et al. 1988).

Em 1985 foi publicado o primeiro trabalho que se utilizou da técnica de PCR. Neste trabalho, SAIKI et al. (1985) amplificaram uma sequência do gene de β -globina humana visando diagnosticar a anemia falciforme em embriões. Através da digestão das sequências amplificadas pela enzima de restrição *Hinf I*, os autores puderam diferenciar indivíduos normais e indivíduos anêmicos.

Até 1988, uma das maiores dificuldades em se realizar a técnica de PCR era a falta de estabilidade térmica do fragmento Klenow extraído da DNA polimerase I de *Escherichia coli*. O fragmento Klenow de *E. coli* consiste em uma cadeia simples de polipeptídeos produzida pela clivagem da DNA polimerase I intacta com tripsina (JACOBSEN et al. 1974). Com o uso da Klenow, a cada ciclo de amplificação mais enzima tinha de ser adicionada a reação.

SAIKI et al. (1988) utilizaram pela primeira vez a DNA polimerase termoestável purificada a partir da bactéria *Thermus aquaticus* (Taq polimerase). Esta enzima sobrevive a incubação a 95°C não sendo afetada pela temperatura de desnaturação do DNA, e podendo portanto ser adicionada a reação apenas no início da mesma, sem necessidade de reposição. Esta modificação, não apenas simplificou a técnica tornando-a passível da automatização, mas ainda melhorou a quantidade do produto da amplificação, aumentando a especificidade e o rendimento, e ainda tornando possível a amplificação de moléculas de maior tamanho (SAIKI et al, 1988).

O aumento da especificidade ocorre porque a Klenow DNA polimerase I era utilizada a uma temperatura de 37°C, ou seja a uma baixa estringência (baixa

temperatura de anelamento) o que resultava em formação de grande quantidade de fragmentos não específicos (SAIKI et al, 1988). O uso da Taq polimerase permitiu a elevação da temperatura de anelamento para 40°C ou mais e ainda a utilização de uma temperatura de extensão de 70 °C o que melhorou a qualidade da amplificação e tornou possível amplificar sequências de até 2500 pares de bases (ERLICH et al, 1988). O aumento da estringência da amplificação faz com que ocorra um melhor aproveitamento dos elementos envolvidos na reação, tais como dNTPs e enzima. Em reações não específicas há uma competição por estes elementos durante os ciclos de amplificação (SAIKI, 1988).

Até 1990, passados sete anos da formulação da técnica de PCR por Mullis, cerca de 1000 trabalhos já haviam sido publicados utilizando-se desta técnica para diferentes finalidades (MULLIS, 1990).

Segundo LIZARDI; KRAMER (1991), o maior impacto da técnica de PCR está no campo dos diagnósticos para a detecção de agentes infecciosos ou defeitos genéticos. Uma das grandes vantagens desta técnica é a quantidade de material inicial necessária. OU et al. (1988), mostraram que com o uso da técnica de PCR, é possível detectar infecção por HIV-1 em amostras contendo até mesmo uma única célula infectada. No estudo de SAIKI et al (1988) sobre anemia falciforme apenas 20ng de material genético foram suficientes para a obtenção de resultados favoráveis.

Para a produção animal, a técnica de PCR também tem sido largamente utilizada tanto para diagnosticar doenças, como para identificar animais portadores de variáveis genéticas favoráveis ou não para seleção (COUTINHO; REGITANO, 1995).

POLLEVICK et al (1992), utilizaram a técnica de PCR para identificação do sexo de embriões bovinos partindo de material genético obtido da biópsia destes embriões. O polimorfismo do hormônio de crescimento bovino ou somatotropina bovina tem sido investigado em alguns trabalhos com a utilização da técnica de PCR que mostrou ser um método rápido e eficiente para análise de genótipo (ZHANG et al.1993; UNANIAN et al. 1994). A doença conhecida como deficiência na adesão de leucócitos, diagnosticada em bovinos da raça Holandesa e conhecida como BLAD, é uma doença autossômica

recessiva que é fatal para animais homozigotos recessivos para o gene CD18, porém os animais heterozigotos portadores deste alelo recessivo perpetuam a variante indesejável na espécie. Estes animais podem ser facilmente diagnosticados pela técnica de PCR e descartados da seleção (SHUSTER et al. 1992).

O gene do fator de crescimento semelhante a insulina, tem sido estudado como gene candidato para a identificação de locos quantitativos. Neste gene a técnica de PCR permite a amplificação de uma sequência microssatélite cujo polimorfismo está sendo utilizado para o estudo da raça Canchim (REGITANO et al, 1995).

A síndrome do stress suíno (PSS) é resultado de uma mutação causada pela substituição de uma única base em um gene que controla a concentração do cálcio em células musculares. No passado, esta mutação era detectada pelo uso de gás halotano, já que animais homozigotos para esta síndrome apresentam reação a este gás, o qual porém não é capaz de identificar os animais heterozigotos. Hoje a técnica de PCR permite a identificação do genótipo dos animais através da amplificação de uma região no gene do halotano (FUJII et al, 1991).

2.6- Alguns Parâmetros em Genética de Populações

A constituição genética de uma população pode ser completamente descrita pela proporção de indivíduos pertencentes a cada genótipo, ou em outras palavras pelas frequências genotípicas da população (FALCONER, 1987). Durante a reprodução, os genótipos dos pais são desfeitos, e um novo grupo de genótipos é constituído na progênie proveniente dos genes transmitidos pelos gametas. Os genes encontrados em populações tem, portanto, continuidade de geração para geração, o que não acontece com os genótipos nos quais eles aparecem, indicando a importância da frequência gênica no estudo de populações (FALCONER, 1987).

Em uma grande população, sob acasalamento ao acaso, na ausência de migração, mutação e seleção, tanto as frequências gênicas como as frequências genotípicas são constantes de geração em geração. Estas propriedades da população foram primeiramente demonstradas por Hardy e por Weinberg, em 1908, e são conhecidas como leis de Hardy-Weinberg (STERN, 1943). A lei de Hardy-Weinberg, é totalmente correta apenas em populações infinitamente grandes e quando os acasalamentos são feitos ao acaso, porém esta lei é aproximadamente correta para a grande maioria dos genes nas espécies aonde o cruzamento é controlado (CROW; KIMURA, 1970). Na verdade, na maioria das espécies criadas pelo homem, a manutenção das frequências gênicas e genotípicas a cada geração é mais dependente do balanço entre migração, mutação e seleção do que da ausência destes fatores.

Ao se analisar diferentes subpopulações, as frequências gênicas e genotípicas destas, podem ser utilizada para verificação de sua homogeneidade, o que é especialmente importante na análise de agrupamentos (WEIR, 1990).

Experimentos comparando dados sobre diferentes populações, normalmente tem o objetivo de verificar o quanto estas populações são próximas. As distâncias genéticas são capazes de expressar numericamente a diferença genética existente entre duas populações (SMITH, 1977). Caso não exista diferenças, a distância pode ser zero, enquanto caso as populações em estudo não possuam alelos em comum, a distância pode chegar ao valor máximo de um (WEIR, 1990).

O cálculo de distância pode ter diferentes objetivos, como simplesmente uma comparação entre populações, ou mesmo servir de base para a construção da história evolutiva das populações. Os diferentes objetivos exigem diferentes distâncias e diferentes modelos genéticos (WEIR, 1990). Para a investigação da proximidade entre dois objetos, a medida mais utilizada é a distância euclidiana, e sua primeira medida derivada, o coeficiente da distância euclidiana média. Esta última medida é apenas um rescalonamento da distância anterior, possuindo as mesmas propriedades, entretanto com duas vantagens, a primeira é que pode ser usada na ausência de dados para algumas

coordenadas e a segunda é que permite acumular evidências empíricas sobre níveis de parença (BUSSAB et al, 1990).

A distância de Nei, também bastante utilizada é apropriada para estudos de evolução aonde as populações divergiram devido a mutação ou formação de grupos. Neste caso, a distância é proporcional ao tempo de divergência a partir da população ancestral, o que porém só é verdadeiro caso a população em estudo tenha evoluído sem interferência direta do homem (WEIR, 1990).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Materiais

3.1.1- Soluções e Tampões

TAMPÃO PARA LISE DE CÉLULAS

sacarose.....	0,32 M
tris-HCl (pH 7,5).....	10 mM
MgCl ₂	5 mM
triton-X.....	1%

TAMPÃO PARA PCR

KCl.....	50 mM
tris-HCl (pH 8,3).....	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
triton-X.....	1%

A este tampão imediatamente antes do uso foram adicionadas 6 µg de proteinase K para cada 100 µl de tampão.

TAMPÃO DE REAÇÃO DA TAQ 10X

tris-HCl (pH8,4).....	200mM
KCl.....	500mM
MgCl ₂	15mM

TAMPÃO DA AMOSTRA 6X (LOADING BUFFER)

bromofenol blue.....	0,25%
xileno cianol.....	0,25%
glicerol em água.....	30%

Estocado a 4°C e utilizado na concentração 1X.

TAMPÃO DE DIGESTÃO (REACT 2)

tris-HCl (pH 8,0).....	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl.....	50 mM

Este tampão é armazenado a -20°C e utilizado com as enzimas *Hinf I* e *Hae III*.

TBE 10X (TRIS-BORO-EDTA)

tris-base.....	0,089 M
ácido bórico.....	0,089 M
EDTA 0,5 M (pH 8,0).....	0,002 M

Completo-se o volume para 1000 ml com água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

Foi utilizado TBE 1X nos géis de agarose.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE BROMETO DE ETÍDEO

brometo de etídeo.....	0,05 g
água destilada.....	5 ml

A solução sofreu agitação por várias horas e foi armazenada em frasco escuro a 4°C. Posteriormente foi utilizada para corar os fragmentos de DNA após a eletroforese na concentração de 0,5 µg/ml (25 µl de solução estoque para 500ml de água destilada).

3.2-Métodos

3.2.1- Obtenção das Amostras

Foram coletadas amostras de sangue dos animais das diversas raças em fazendas comerciais particulares, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, na EMBRAPA-CPPSE e em unidades do Instituto de Zootecnia.

- ESALQ - USP, Piracicaba, SP
 - Raça Holandesa (29 amostras)
 - Raça Nelore (37 amostras)
- EMBRAPA - CPPSE, São Carlos, SP
 - Raça Holandesa (30 amostras)
- INSTITUTO DE ZOOTECNIA, Ribeirão Preto, SP
 - Raça Gir (50 amostras)
- INSTITUTO DE ZOOTECNIA, Sertãozinho, SP
 - Raça Nelore (50 amostras)
 - Raça Gir (33 amostras)
 - Raça Caracu (79 amostras)

- FAZENDA DO MADÚ, São Roque, SP
Raça Holandesa (30 amostras)
- USINA SÃO GERALDO, Sertãozinho, SP
Raça Nelore (31 animais)

As coletas em diferentes locais resultaram em um total de 89 amostras da raça Holandesa, 118 amostras da raça Nelore, 79 amostras da raça Caracu e 83 amostras da raça Gir.

O sangue destes animais foi coletado em tubos Vacutainer contendo 7,5 mg de EDTA. Imediatamente após a retirada do sangue de cada animal os tubos iam sendo colocados em gelo picado e posteriormente no fim de cada coleta armazenados a 4°C. A extração de DNA das amostras foi realizada no dia posterior a coleta de sangue.

3.2.2- Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de 0,5 ml de sangue homogeneizado de cada uma das amostras coletadas. Esta quantidade de sangue foi colocada em um eppendorf com capacidade para 1,5 ml e adicionados 0,5 ml de tampão de lise de eritrócitos. Os tubos após serem homogeneizados foram centrifugados a 13.000 G por 20 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet restante ressuspense em 1ml de tampão de lise de células com o auxílio de vortex. Os tubos foram novamente centrifugados a 13.000 G por 20 segundos com posterior descarte do sobrenadante.

Os passos de ressuspensão, centrifugação e descarte do sobrenadante repetiram-se por mais duas vezes resultando em um total de três centrifugações e ressuspensões.

Após a última centrifugação com tampão de lise de células, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em 0,5 ml de tampão para PCR contendo 6µg de

proteínase K para cada 100µl de tampão. Os tubos foram encubados a 55°C por uma hora e a seguir a 95°C por 10 minutos para a inativação da proteínase K.

As amostras foram armazenadas a - 20°C até sua utilização.

3.2.3- Amplificação do DNA

O DNA foi amplificado através da técnica de PCR com o auxílio de um aparelho PTC-100 Programmable Thermal Controller da MJ Research, Inc., USA. Para as reações foram utilizados tubos autoclavados do tipo eppendorf com capacidade para 0,5 ml. O volume final das reações foi de 25 µl sendo que antes dos tubos serem colocados no aparelho de PCR uma gota de óleo mineral foi adicionada a cada reação para prevenir a evaporação das amostras. Os primers utilizados foram obtidos na forma liofilizada da National Biosciences Inc. (Annapolis, USA).

3.2.3.1- Amplificação do Loco de Kappa-Caseína

Foi amplificada uma sequência de 350 pares de bases localizada entre os nucleotídeos 201 do exon IV e 149 do intron IV do loco de kappa-caseína. Para esta amplificação foram utilizados os primers descritos por MEDRANO; CORDOVA (1990a) com as seguintes sequências:

KCN-UP : 5'- ATC ATT TAT GGC CAT TCC ACC AAA G - 3'

KCN-DOWN: 5'- GCC CAT TTC GCC TTC TCT GTA ACA GA - 3'

Cada reação de amplificação com volume final de 25 µl consistiu de :

- 5 µl de DNA genômico extraído de acordo com o protocolo apresentado;
- 2,5 µl de tampão (10X) de reação da taq polimerase;
- 200 nM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos - dATP, dGTP, dTTP e dCTP);
- 400 nM de cada um dos primers descritos anteriormente;
- 0,5 unidades de taq polimerase.

A amplificação do loco de kappa-caseína ocorreu durante 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão:

- desnaturação : 45 segundos a 94°C.
- anelamento : 1 minuto a 55 °C.
- extensão : 1 minuto e 15 segundos a 73 °C.

Ao fim dos 30 ciclos, as amostras foram resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C até a continuidade das análises.

3.2.3.2- Amplificação do Loco de β -Lactoglobulina

Foi amplificada uma sequência de 247 pares de bases entre os nucleotídeos 23 do exon IV e 158 do intron IV do loco de β -lactoglobulina. Os primers utilizados foram descritos por MEDRANO; CORDOVA (1990b):

JBLG2 : 5'- TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G - 3'

JBLG3 : 5'- GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT - 3'

Cada reação de amplificação com volume final de 25 µl consistiu de:

- 5 µl de DNA genômico extraído de acordo com protocolo anterior;
- 2,5 µl de tampão (10X) de reação da taq polimerase;
- 200 nM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos - dATP, dGTP, dTTP e dCTP);
- 80 pM de cada um dos primers descritos;
- 0,5 unidades de taq polimerase

Para a amplificação do loco de β -lactoglobulina foi necessária a utilização de “Hot Start” para melhorar a especificidade da reação. Desta forma todos os reagentes com exceção da taq polimerase foram adicionados aos tubos de reação que foram então colocados no termociclador a 95°C durante 5 minutos e então resfriados a 60 °C até que a taq polimerase fosse adicionada a todos os tubos de reação. Após o “Hot Start” as amostras foram amplificadas por 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão :

- desnaturação : 45 segundos a 94°C.
- anelamento : 1 minuto a 55 °C.
- extensão : 1 minuto e 15 segundos a 73 °C.

Ao fim dos 30 ciclos as amostras foram resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C até a continuidade das análises.

3.2.4- Digestão das Amostras Amplificadas

O produto da amplificação foi digerido com enzimas de restrição para possibilitar a diferenciação do genótipo dos animais. A enzima de restrição utilizada para as análises de genótipo de kappa-caseína foi a enzima *Hinf I*, enquanto para as análises de genótipo de β -lactoglobulina foi utilizada a enzima *Hae III*. Ambas as enzimas agem em uma temperatura ótima de 37°C.

As digestões com a enzima *Hinf I* foram realizadas em tubos do tipo eppendorf com capacidade para 0,5 ml sendo que cada reação teve um volume final de 13 µl constituído por:

- 10 µl de produto da amplificação do loco de kappa-caseína;
- 10% de tampão de digestão (react 2);
- 2,5 unidades de *Hinf I*.

As digestões com *Hae III* também foram realizadas em tubos do tipo eppendorf com capacidade para 0,5 ml e tiveram um volume final de 15 µl sendo:

- 12 µl de produto da amplificação do loco de β-lactoglobulina;
- 10% de tampão de digestão (react 2);
- 12,5 unidades de *Hae III*.

Ao se transferir o produto da amplificação para o tubo de digestão, foi tomado o cuidado de não transferir juntamente o óleo mineral usado para evitar a evaporação das amostras durante a amplificação, isto porque este poderia atrapalhar a digestão das amostras.

As amostras de digestão com ambas as enzimas foram encubadas a 37°C durante duas horas e em seguida armazenadas a -20 °C até a continuação das análises.

3.2.5- Eletroforese em Gel de Agarose

Os géis de agarose foram utilizados na concentração de 3% para as análises do loco de kappa-caseína e 4% para as análises do loco de β-lactoglobulina. Em ambos os casos foi utilizada agarose de baixo ponto de fusão (LMP) dissolvida em TBE 1X. A

mistura de agarose e TBE 1X foi agitada com agitador magnético por alguns minutos e a seguir aquecida para facilitar a dissolução. O gel foi então resfriado até aproximadamente 50 °C e então vertido em uma cuba de eletroforese horizontal, quando foram então colocados os pentes que formam os poços para colocação das amostras. Deixou-se o gel solidificar por cerca de 30 minutos após os quais a cuba de eletroforese foi preenchida com TBE 1X e os pentes retirados.

Às amostras de DNA digeridas foi adicionado loading buffer. Cerca de 10 µl de cada amostra foram aplicados nos poços do gel que foi então submetido a uma corrente de 5V/cm durante 40 minutos.

3.2.6- Visualização dos Fragmentos de DNA

Após a eletroforese o gel foi mergulhado em uma solução de brometo de etídeo com concentração de 0,5 µg/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente e a seguir foi mergulhado em água destilada durante 20 minutos.

O DNA foi visualizado através da exposição do gel a luz ultravioleta e fotografado com filme Polaroid 667.

3.3- Análise dos Genótipos

Os genótipos foram determinados a partir da leitura dos géis de agarose baseando-se para tal no tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a digestão com enzimas de restrição. Com estes dados foram calculadas as frequências gênicas e genotípicas. Foi verificado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos rebanhos, a homogeneidade entre os rebanhos e a distância Euclidiana média entre as diferentes populações estudadas.

3.3.1- Cálculo da Frequência Genotípica

A frequência genotípica foi calculada em cada raça estudada para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina individualmente assim como para os dois locos em conjunto.

Cada loco estudado possui dois alelos : A e B e portanto os possíveis genótipos encontrados são AA, AB e BB tanto para o gene de kappa-caseína como para β -lactoglobulina. A frequência genotípica para cada loco é portanto:

$$F(AA) = \frac{N_{AA}}{N}$$

$$F(AB) = \frac{N_{AB}}{N}$$

$$F(BB) = \frac{N_{BB}}{N}$$

aonde :

N_{AA} , N_{AB} e N_{BB} = número de animais observados com os genótipos **AA**,
AB e **BB**;

N = número total de animais.

Para os dois locos em conjunto temos nove genótipos possíveis (3^2) e a frequência genotípica é calculada dividindo-se o número de animais de cada genótipo pelo número total de animais.

3.3.2- Cálculo da Frequência Gênica e Erro-Padrão

A frequência gênica foi calculada em cada rebanhos e em cada raça para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina individualmente.

Considerando-se a frequência do alelo **A** de cada um dos locos como “p”, e a frequência do alelo **B** como “q” temos:

$$p = \frac{2N_{AA} + N_{AB}}{2N}$$

$$q = \frac{2N_{BB} + N_{AB}}{2N}$$

aonde:

N_{AA} = número de animais de genótipo **AA**;

N_{AB} = número de animais de genótipo **AB**;

N_{BB} = número de animais de genótipo **BB**;

N = número total de animais.

Erro-padrão da frequência gênica :

$$EP = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2n}}$$

aonde : p = frequência do alelo A;

n = número total de indivíduos.

3.3.3- Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para todos os rebanhos tanto para o loco de kappa-caseína como para o loco de β -lactoglobulina através do valor de chi-quadrado (χ^2).

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(n_o - n_e)^2}{n_e} \right]$$

aonde: n_o = número observado de animais

n_e = número esperado de animais

O valor de χ^2 obtido foi comparado com o valor de χ^2 tabelado com um grau de liberdade.

3.3.4- Teste de Homogeneidade

Para realizar este teste o valor de χ^2 de cada rebanho dentro de uma mesma raça foi calculado e estes valores somados resultando no χ^2 da soma. O χ^2 de cada raça foi também calculado e então utilizou-se a fórmula:

$$\text{homogeneidade} = \chi^2 \text{ da soma} - \chi^2 \text{ da raça}$$

O valor obtido para o teste de homogeneidade foi comparado aos valores de χ^2 tabelados com um grau de liberdade.

3.3.5- Distância Euclidiana Média (DEM)

A distância Euclidiana média entre todos os rebanhos foi calculada para o loco de kappa-caseína, para o loco de β -lactoglobulina e para os dois locos em conjunto. Estes valores geraram uma matriz de parença utilizada para a construção de dendrogramas através de técnicas de agrupamento.

As análises de agrupamentos foram realizadas utilizando-se o método das médias das distâncias ou UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages). Este é um processo hierárquico, e em cada passo diminui uma dimensão da matriz de parença pela reunião de pares mais semelhantes até reunir todos os pontos em um único grupo (BUSSAB et al, 1990).

Para a análise da distância Euclidiana média das raças, foram calculados os coeficientes médios dentro de cada raça e os coeficientes médios entre raças, a partir da matriz de parença entre todos os rebanhos de acordo com um modelo hierárquico (VENCOVSKY, comunicação pessoal). Estes coeficientes médios foram utilizados para a elaboração de matrizes de parença entre raças, gerando um dendrograma a partir de técnicas de agrupamento.

O cálculo da distância Euclidiana média foi feito pela fórmula (CROW; KIMURA, 1970):

$$d(i, k) = \sum_j \sqrt{\frac{(x_{ij} - x_{kj})^2}{j}}$$

para $i = 1, \dots, 4$ e $j = 1, 2$

aonde: x_{ij} = frequência do alelo j no rebanho i ;

x_{kj} = frequência do alelo j no rebanho k .

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Determinação dos Genótipos

4.1.1- Kappa-caseína

A determinação dos alelos **A** e **B** do gene de kappa-caseína foi obtida através da amplificação de um fragmento de 350 pares de bases entre o exon IV e o intron IV. Após a amplificação foi feita a digestão com a enzima de restrição *Hinf I* que reconhece a sequência:

O fragmento amplificado a partir do alelo **A** do gene de kappa-caseína possui dois sítios de restrição para a enzima *Hinf I*, o que provoca dois cortes na sequência de DNA amplificada durante a digestão, resultando em três fragmentos : um com 134 pares de bases, outro com 132 e o terceiro com 84 pares de bases (FIGURA 1). Em gel de agarose não é possível a separação dos fragmentos de 134 e 132 pares de bases e estes são visualizados como uma única banda.

O fragmento amplificado a partir do alelo **B** do gene de kappa-caseína possui apenas um sítio de restrição para a enzima *Hinf I*, o que resulta em um corte na sequência amplificada com formação de dois fragmentos: um de 266 pares de bases e outro de 84 pares de bases (FIGURA 1). Como os dois alelos possuem o fragmento de 84 pares de bases em comum, este é utilizado como controle da digestão, enquanto os fragmentos restantes são utilizados para a determinação do genótipo (MEDRANO; CORDOVA, 1990a).

O marcador de peso molecular ϕ X 174 RF digerido com *Hae III*, foi utilizado para a determinação do tamanho dos fragmentos observados em gel de agarose. Para animais homozigotos **AA** foram observados dois fragmentos identificados como tendo 132-134 e 84 pares de bases; animais homozigotos **BB** apresentaram fragmentos de 266 e 84 pares de bases e animais heterozigotos **AB** apresentaram fragmentos de 266, 132-134 e 84 pares de bases (FIGURA 2).

Outras enzimas de restrição podem ser utilizadas para detectar o polimorfismo nesta região do gene da kappa-caseína. O alelo **B** do gene de kappa-caseína possui um sítio de restrição para a enzima *Taq I* e outro sítio para a enzima *Hind III*, enquanto no alelo **A** deste gene não há sítio de restrição para estas enzimas.

4.1.2- β -lactoglobulina

Os alelos **A** e **B** do gene de β -lactoglobulina foram determinados através da amplificação de um fragmento de 247 pares de bases entre o exon IV e o intron IV. A enzima de restrição utilizada para a digestão dos fragmentos amplificados foi a *Hae III* que reconhece a sequência:

KAPPA-CASEÍNA ALELO A : **KAPPA-CASEÍNA ALELO B :**

FIGURA 1- Sítios de restrição para a enzima *Hinf I* encontrados em fragmentos de DNA amplificados a partir dos alelos **A** e **B** do gene de kappa-caseína. Os números indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, após digestão pela enzima de restrição.

FIGURA 2. Genótipos para kappa-caseína : **M**= marcador; **ND**= não digerido; **AA**, **AB**, **BB**= Diferentes genótipos obtidos; **(-)**= negativo.

O fragmento amplificado a partir do alelo **A** do gene de β -lactoglobulina possui um sítio de restrição para a enzima *Hae III*, resultando na formação de dois fragmentos, um de 148 pares de bases e o outro de 99 pares de bases (FIGURA 3). O fragmento amplificado a partir do alelo **B** possui dois sítios de restrição para a enzima *Hae III*, resultando em três fragmentos após a digestão, sendo dois fragmentos de 74 pares de bases e um terceiro de 99 pares de bases (FIGURA 3). Como ocorreu para kappa-caseína, um dos fragmentos é comum aos dois alelos sendo então utilizado como controle da digestão, enquanto os restantes são utilizados para a detecção do genótipo (MEDRANO; CORDOVA, 1990b).

O marcador de peso molecular ϕ X 174 RF digerido com *Hae III* foi utilizado para determinar o tamanho esperado dos fragmentos obtidos após a digestão. Animais **AA** para β -lactoglobulina tiveram dois fragmentos observados em gel de agarose, sendo estes de 148 e 99 pares de bases; animais **BB** apresentaram fragmentos de 99 pares de bases e de 74 pares de bases e animais **AB** apresentaram três fragmentos : 148, 99 e 74 pares de bases (FIGURA 4).

A enzima de restrição *Hph I* pode ser também utilizada para a detecção do polimorfismo do gene de β -lactoglobulina. Esta enzima encontra um sítio de restrição apenas no alelo **B** do gene de β -lactoglobulina, mantendo o alelo **A** intacto durante a digestão. A enzima *Hae III* porém, tem sido preferencialmente utilizada devido ao seu custo cerca de dez vezes menor do que o da enzima *Hph I* (TEE et al, 1990).

4.2- Frequências Gênicas e Genotípicas

4.2.1- Raça Holandesa

A frequência genotípica nos três rebanhos da raça Holandesa estudados assim como a frequência total obtida para esta raça estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela

β -LACTOGLOBULINA ALELO **A** :

β -LACTOGLOBULINA ALELO **B** :

FIGURA 3- Sítios de restrição para a enzima *Hae III* encontrados em fragmentos de DNA amplificados a partir dos alelos **A** e **B** do gene de β -lactoglobulina. Os números indicam o tamanho dos fragmentos em pares de bases após digestão pela enzima de restrição.

FIGURA 4. Genótipos para β -lactoglobulina : **M**= marcador; **ND**= não digerido; **AA**, **AB**, **BB**= Diferentes genótipos obtidos; **(-)**= negativo.

2 encontram-se os valores da frequência gênica e os respectivos erros-padrões para a raça Holandesa considerando-se os rebanhos individualmente e a raça como um todo.

Todos os rebanhos estudados para esta raça se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina considerados individualmente. Isto mostra que as frequências gênicas nestas populações estão se mantendo constantes a cada geração, ou seja, não estão sendo afetadas por mutação, migração e seleção (LERNER, 1958). Podemos dizer que a manutenção do equilíbrio em uma população é normalmente mais dependente do balanço entre mutação, migração e seleção do que da ausência destes fatores.

O teste de homogeneidade entre os rebanhos da raça Holandesa não apresentou resultado significativo o que mostra que todos os rebanhos estudados pertencem a uma mesma população.

Diferentes rebanhos de uma raça pura normalmente podem ser considerados como populações muito próximas (BARKER, 1989). Este fato se deve em grande parte ao movimento de migração entre rebanhos dentro de uma raça, já que este movimento é grande o suficiente para impossibilitar uma grande diferenciação genética. Para rebanhos leiteiros esta proximidade genética teve grande influência da inseminação artificial e da transferência de embriões (KING, 1989).

A consequência genética desta homogeneidade entre rebanhos é que apenas uma fração das diferenças em performance é devida a variação genética dos rebanhos (BARKER, 1989). DeNISE et al (1993) comentam que apenas 25% da diferença na produção de leite entre rebanhos da raça Holandesa é devida a fatores genéticos.

O uso de técnicas como a inseminação artificial, permite que o germoplasma desejado seja facilmente conservado, transportado e distribuído dentro dos países e ao redor do mundo. Em um estudo feito sobre a raça Holandesa nos Estados Unidos, verificou-se que o número de touros efetivamente utilizados por geração estava por volta de 30 animais, número bastante pequeno para uma raça que possui milhares de descendentes a cada geração (BARKER, 1989).

TABELA 1 - Frequências genotípicas para os locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) em diferentes rebanhos da raça Holandesa e para o total da raça.

Rebanho	FREQ. GENOTÍPICA (%)					
	K-CN (89)			β -LG (89)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
H-1 (29)	72	24	4	21	41	38
H-2 (30)	64	33	3	13	57	30
H-3 (30)	63	30	7	17	43	40
TOTAL	66	29	5	17	47	36

() = número de animais genotipados

H-1 = ESALQ, H-2 = EMBRAPA, H-3 = SÃO ROQUE

TABELA 2- Frequência dos alelos **A** e **B** dos genes de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) com os respectivos erros-padrões em diferentes rebanhos da raça Holandesa e para o total da raça.

Rebanho	FREQ. GÊNICA			
	K-CN (89)		β -LG (89)	
	alelo A $\pm$ EP	alelo B $\pm$ EP	alelo A $\pm$ EP	alelo B $\pm$ EP
H-1 (29)	0,85 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,06
H-2 (30)	0,80 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,06
H-3 (30)	0,78 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,06
TOTAL	0,81 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,06

() = número de animais genotipados

H-1 = ESALQ, H-2 = EMBRAPA, H-3 = SÃO ROQUE

A disseminação de germoplasma desejado também pode ser sentida no Brasil, quando comparamos os resultados deste estudo a outros feitos em diferentes países que obtiveram resultados semelhantes para frequências gênicas e genótípicas nos genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina como SABOUR et al (1993) e NG-KWAI-HANG et al (1984) no Canadá; RON et al (1994) em Israel e EENENNAAM; MEDRANO (1991) nos Estados Unidos. Estes estudos anteriores, comprovaram a superioridade dos animais portadores do alelo **B** para o gene de kappa-caseína e β -lactoglobulina, na produção de proteína e gordura no leite e ainda em características de processamento do leite.

As diferenças existentes entre as frequências obtidas para os diferentes rebanhos neste estudo e em estudos anteriores, é possivelmente devida ao tamanho da população amostrada, mas não é uma diferença suficiente para causar heterogenidade entre os rebanhos. Outro fator que pode estar influenciando esta diferença, é que pelo fato do alelo **B** do gene de kappa-caseína estar presente na população em uma frequência muito baixa, o que pode fazer com que animais portadores deste alelo não sejam amostrados durante as coletas, resultando na obtenção de uma frequência gênica na amostra diferente da existente na população.

A Tabela 3 mostra os genótipos resultantes da combinação entre os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina com as frequências observadas e esperadas para os nove genótipos possíveis em animais da raça Holandesa.

As frequências genótípicas observadas estão de acordo com as frequências esperadas, uma vez que a diferença entre elas não é significativa ($P>0,05$). Isto mostra que a raça Holandesa está em equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando-se os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em conjunto. Resultados semelhantes para a frequência genotípica dos locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina foram obtidos por RON et al (1994) estudando touros da raça Holandesa.

TABELA 3- Frequências genotípicas observadas e desvio em relação as frequências genotípicas esperadas dos locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) considerados em conjunto para uma amostra de 89 animais da raça Holandesa.

K-CN	β -LG			TOTAL
	AA	AB	BB	
AA	0,14 (+0,03)	0,31 (0,0)	0,21 (-0,02)	0,66
AB	0,03 (-0,01)	0,15 (0,0)	0,11 (0,0)	0,29
BB	0,00 (+0,005)	0,01 (-0,007)	0,04 (+0,02)	0,05
TOTAL	0,17	0,47	0,35	1,00

() desvio das frequências esperadas em relação as observadas

4.2.2- Raça Nelore

As Tabelas 4 e 5 mostram os valores das frequências gênicas e genotípicas para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina, considerando-se os três rebanhos estudados e a raça Nelore como um todo.

Observa-se que a frequência do alelo **B** para o loco de kappa-caseína na raça Nelore é bastante baixa, e que nenhum animal homozigoto **BB** foi encontrado na amostragem desta raça. Quando a frequência de um dos alelos é baixa, o número de animais heterozigotos é bem maior do que o número de animais homozigotos para o alelo mais raro (CROW; KIMURA, 1970), o que explica o fato de que 16% dos animais estudados serem heterozigotos para o loco de kappa-caseína, apesar de nenhum animal homozigoto **BB** ter sido encontrado.

O tamanho da amostragem pode ter influenciado a frequência nula obtida para o genótipo **BB**. Este fato deve ter ocorrido provavelmente devido a “perda” de animais

TABELA 4 - Frequências genotípicas em porcentagem para os locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) em diferentes rebanhos da raça Nelore e para o total da raça.

Rebanho	FREQ. GENOTÍPICA (%)					
	K-CN (118)			β -LG (118)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
N-1 (37)	86	14	0	35	35	30
N-2 (50)	84	16	0	6	28	66
N-3 (31)	81	19	0	16	29	55
TOTAL	84	16	0	18	30	52

() = número de animais genotipados

N-1= ESALQ, N-2=IZ, SERTÃOZINHO, N-3=US. SÃO GERALDO

TABELA 5- Frequência dos alelos **A** e **B** dos genes de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) com os respectivos erros-padrões em diferentes rebanhos da raça Nelore e para o total da raça.

Rebanho	FREQ. GÊNICA			
	K-CN (118)		β -LG (118)	
	alelo A $\pm$ EP	alelo B $\pm$ EP	alelo A $\pm$ EP	alelo B $\pm$ EP
N-1 (37)	0,93 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,06
N-2 (50)	0,92 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,04
N-3 (31)	0,90 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,05
TOTAL	0,92 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,03

() = número de animais genotipados

N-1 = ESALQ, N-2 = IZ, SERTÃOZINHO, N-3 = US. SÃO GERALDO

com este genótipo durante a amostragem, ou seja, animais portadores deste genótipo deixaram de ser amostrados.

Os três rebanhos estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco de kappa-caseína, mostrando que a frequência gênica neste loco se mantém constante ao longo das gerações. Para o loco de β -lactoglobulina os rebanhos da ESALQ e do IZ, Sertãozinho se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém o teste de χ^2 para o rebanho da Usina São Geraldo foi significativo ($P < 0,05$) indicando que este rebanho não está em equilíbrio para o loco de β -lactoglobulina.

O afastamento do equilíbrio observado no rebanho da Usina São Geraldo indica que o balanço entre mutação, migração e seleção não está ocorrendo de forma a evitar mudanças na frequência gênica. Como normalmente a mutação não é um fator que influencia a curto prazo a mudança na frequência gênica, já que suas taxas estão por volta de 10^{-4} a 10^{-8} gametas por geração (FALCONER, 1987), os fatores que devem efetivamente estar influenciando a mudança na frequência gênica desta população são a seleção e a migração.

Apesar de uma das populações estudadas não estar em equilíbrio, ao se considerar a raça como um todo através da amostragem dos 118 animais estudados observamos a manutenção do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois locos. Este fato pode ser observado na Tabela 6 onde estão apresentadas as frequências genotípicas observadas e esperadas para os nove genótipos possíveis considerando-se os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em conjunto. Mesmo com algumas diferenças entre frequência observada e frequência esperada, o teste de χ^2 não foi significativo ($P > 0,05$) indicando equilíbrio nesta raça.

O teste de homogeneidade para os rebanhos da raça Nelore foi significativo ($P < 0,05$) o que mostra que os diferentes rebanhos estudados não pertencem a mesma população. Em rebanhos leiteiros um fator que veio a auxiliar a homogeneidade entre os rebanhos foi a inseminação artificial, capaz de promover disseminação de germoplasma através dos rebanhos. A baixa taxa de inseminação artificial em rebanhos bovinos de

corte é um dos fatores a influenciar a heterogenidade entre rebanhos de uma mesma raça. Nos Estados Unidos menos de 10% dos rebanhos bovinos de corte são inseminados artificialmente o que reduz a taxa de migração entre os rebanhos e assim a disseminação de germoplasma (NTIS, 1981).

No Brasil a situação dos rebanhos de bovinos de corte não é diferente, já que a implantação da inseminação artificial enfrenta empecilhos como a dificuldade de determinação do estro, a falta de pessoal treinado para realizar a inseminação e a distância entre os grandes centros de criação e as centrais de inseminação.

TABELA 6- Frequências genotípicas observadas e desvio em relação as frequências genotípicas esperadas dos locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) considerados em conjunto para uma amostra de 118 animais da raça Nelore.

K-CN	β -LG			TOTAL
	AA	AB	BB	
AA	0,15 (-0,05)	0,26 (-0,11)	0,43 (-0,05)	0,84
AB	0,03 (+0,01)	0,04 (-0,02)	0,09 (+0,02)	0,16
BB	0,00 (0,0)	0,0 (-0,003)	0,0 (-0,003)	0,0
TOTAL	0,18	0,30	0,52	1,00

() desvio das frequências esperadas em relação as observadas

4.2.3- Raça Gir

As frequências gênicas e genotípicas para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina nos dois rebanhos da raça Gir estudados, assim como o total obtido para esta raça são apresentados nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 - Frequências genotípicas em porcentagem para os locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) em dois rebanhos da raça Gir e para o total da raça.

Rebanho	FREQ. GENOTÍPICA (%)					
	K-CN (83)			β -LG (83)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
G-1 (50)	78	22	0	12	46	42
G-2 (33)	100	0	0	33	15	52
TOTAL	87	13	0	20	34	46

() = número de animais genotipados

G-1 = IZ, RIBEIRÃO PRETO, G-2 = IZ, SERTÃOZINHO

TABELA 8- Frequência dos alelos **A** e **B** dos genes de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) com os respectivos erros-padrões em dois rebanhos da raça Gir e para o total da raça.

Rebanho	FREQ. GÊNICA			
	K-CN (83)		β -LG (83)	
	alelo A $\pm$ EP	alelo B $\pm$ EP	alelo A $\pm$ EP	alelo B $\pm$ EP
G-1 (50)	0,89 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,05
G-2 (33)	1,0 $\pm$ 0,00	0,0 $\pm$ 0,00	0,41 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,06
TOTAL	0,93 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,04

() = número de animais genotipados

G-1 = IZ, RIBEIRÃO PRETO, G-2 = IZ, SERTÃOZINHO

Pode-se observar que 100% dos animais amostrados no rebanho do IZ, Sertãozinho eram homozigotos **AA** para o loco de kappa-caseína. Possivelmente o número de animais amostrados neste rebanho teve influência sobre a frequência gênica obtida. Provavelmente a frequência zero obtida para o alelo **B** do gene de kappa-caseína não indica a inexistência deste alelo na população, e sim que este alelo foi perdido durante a amostragem.

O teste de χ^2 para o rebanho do IZ, Ribeirão Preto não foi significativo ($P > 0,05$) para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina, indicando que este rebanho está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e portanto as frequências gênicas se mantêm constantes ao longo das gerações. Já para o rebanho do IZ, Sertãozinho o teste de χ^2 foi significativo ($P < 0,001$) indicando ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Neste rebanho provavelmente a seleção e a migração sob forma de entrada e saída de animais estão sendo suficientemente grandes para afetar a frequência gênica de geração em geração.

Quando comparamos as frequências gênicas e genotípicas dos dois rebanhos estudados, podemos claramente perceber que existem diferenças entre elas. Este fato se justifica com a origem das amostras: as amostras provenientes do rebanho do IZ, Ribeirão Preto pertencem a animais que foram selecionados para a produção de leite constituindo o chamado Gir leiteiro, enquanto as amostras provenientes do rebanho do IZ, Sertãozinho pertencem a animais selecionados para a produção de carne. Na prática touros com diferentes características e portanto diferenças genética foram utilizados na formação destes dois rebanhos, fazendo com que talvez, a frequência gênica das populações fosse modificada ao longo de alguns anos de seleção, e que a distância genética entre os dois rebanhos aumentasse.

A diferença genética entre os rebanhos pode ser confirmada pelo teste de homogeneidade calculado para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina que foi significativo ($P < 0,05$), indicando que os rebanhos estudados pertencem a populações diferentes.

As populações de gado Gir selecionadas separadamente para a produção de leite e para a produção de carne podem ser consideradas como duas subpopulações distintas

dentro de uma mesma raça. Em alguns casos, este mecanismo de seleção pode provocar a extinção das espécies originais e a substituição destas por outras espécies formadas após a seleção. Este fato nem sempre é desejado uma vez que a seleção entre diferentes grupos é mais eficiente do que a seleção dentro de subpopulações, principalmente quando o número de indivíduos de uma subpopulação é restrito. Quando as subpopulações são formadas, animais de características semelhantes tendem a se agrupar o que reduz a variabilidade dentro dos grupos, dificultando a seleção (CROW; KIMURA, 1970).

A Tabela 9 mostra as frequências genotípicas observadas e esperadas para o total de animais da raça Gir estudados, considerando-se os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em conjunto. O teste de χ^2 neste caso foi significativo ($P < 0,05$) indicando ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg para a raça Gir. Provavelmente o desequilíbrio de um dos rebanhos foi um fator importante a afetar o desequilíbrio da raça.

TABELA 9- Frequências genotípicas observadas e desvio em relação as frequências genotípicas esperadas dos locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) considerados em conjunto para uma amostra de 83 animais da raça Gir.

K-CN	β -LG			TOTAL
	AA	AB	BB	
AA	0,17 (+0,05)	0,27 (-0,14)	0,43 (+0,10)	0,87
AB	0,03 (+0,02)	0,07 (0,0)	0,03 (+0,01)	0,13
BB	0,00 (0,0)	0,0 (-0,002)	0,0 (-0,002)	0,0
TOTAL	0,20	0,34	0,46	1,00

() desvio das frequências esperadas em relação as observadas

4.2.4- Raça Caracu

As 79 amostras de animais da raça Caracu analisadas neste experimento, foram coletadas a prova de ganho de peso realizada na unidade do Instituto de Zootecnia em Sertãozinho em 1995, sendo que destas 35 amostras pertenciam ao rebanho deste Instituto e o restante é provenientes de diversos outros rebanhos comerciais. Como com exceção do rebanho do IZ de Sertãozinho, os demais rebanhos contribuíram na amostragem com um pequeno número de animais, optou-se por analisar todas as amostras desta raça em conjunto, independente de sua origem.

As frequências gênicas e genotípicas para a raça Caracu estão apresentadas nas Tabelas 10 e 11. Pode-se observar que, dentre todas as raças estudadas, a raça Caracu foi a que apresentou valores mais altos para a frequência do alelo **B** do gene de kappa-caseína.

A eficiência da seleção, com a intenção de se elevar a frequência de um determinado alelo na população, depende da frequência gênica inicial deste alelo, sendo que a eficiência é maior nas frequências gênicas intermediárias, tornando-se menos eficiente quando a frequência do alelo de interesse é muito alta ou muito baixa (FALCONER, 1987). Considerando-se este fato, entre as quatro raças estudadas, poderíamos dizer que a raça Caracu teria uma melhor eficiência na seleção para o aumento da frequência do alelo **B** do gene de kappa-caseína, desde que programas adequados de seleção fossem adotados.

Considerando-se apenas as amostras dos animais provenientes do IZ, Sertãozinho, as frequências gênicas observadas para o gene de kappa-caseína foram de 0,74 e 0,26 para os alelos **A** e **B** respectivamente e para o gene de β -lactoglobulina de 0,40 e 0,60 para os alelos **A** e **B** respectivamente se mostrando portanto semelhantes ao total da população.

A população da raça Caracu estudada apresentou um valor significativo de χ^2 ($P < 0,05$) para o loco de kappa-caseína, e para o loco de β -lactoglobulina ($P < 0,001$).

TABELA 10- Frequências genotípicas em porcentagem para os locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) em uma amostra de 79 animais da raça Caracu.

GENÓTIPO	FREQ. GENOTÍPICA (%)	
	K-CN (79)	β -LG (79)
AA	46	37
AB	52	28
BB	02	35

() número de animais amostrados

TABELA 11- Frequências gênicas e respectivos erros-padrões para os alelos A e B dos locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em uma amostra de 79 animais da raça Caracu.

ALELO	FREQ. GÊNICA $\pm$ EP	
	K-CN (79)	β -LG (79)
A	$0,72 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,04$
B	$0,28 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,04$

() = número de animais amostrados

Estes resultados mostram que esta população não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e portanto o balanço entre a mutação, a migração, e a seleção não está ocorrendo de forma a manter as frequências gênicas estáveis de geração em geração.

O desequilíbrio pode ser comprovado com os resultados obtidos na Tabela 12 aonde podem ser vistas as frequências genotípicas observadas e os desvios em relação as frequências esperadas considerando-se os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em conjunto. Neste caso o valor de χ^2 obtido foi significativo ao nível $P < 0,001$.

A ausência de equilíbrio observada nesta população para os dois locos estudados, provavelmente é devida as diferenças existentes entre os rebanhos que contribuíram para a formação da amostra composta analisada neste trabalho. Possivelmente caso cada rebanho fosse analisado individualmente, seria observado equilíbrio dentro do rebanho e heterogenidade entre os rebanhos. O pequeno número de amostras pertencentes a cada rebanho porém tornou inviável esta análise individual.

TABELA 12- Frequências genotípicas observadas e desvio em relação as frequências genotípicas esperadas dos locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) considerados em conjunto para uma amostra de 79 animais da raça Caracu.

K-CN	β -LG			TOTAL
	AA	AB	BB	
AA	0,15 (+0,02)	0,12 (-0,25)	0,19 (+0,06)	0,46
AB	0,22 (+0,10)	0,15 (-0,07)	0,15 (+0,06)	0,52
BB	0,00 (-0,02)	0,01 (-0,03)	0,01 (-0,008)	0,02
TOTAL	0,37	0,28	0,35	1,00

() desvio das frequências esperadas em relação as observadas

4.3.- Distância Genética

A distância genética entre as diferentes populações estudadas foi calculada através da medida da distância euclidiana média (DEM). Para o cálculo desta distância foram utilizadas as frequências gênicas obtidas para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina, em todos os rebanhos estudados.

A DEM foi calculada para o loco de kappa-caseína e β -lactoglobulina em separado e para os dois locos juntos utilizando-se inicialmente os dados obtidos para cada um dos rebanhos. Em seguida foi calculada a DEM entre raças, utilizando-se para tal os coeficientes médios, obtidos a partir das distâncias entre rebanhos de diferentes raças. Os valores obtidos para o cálculo de DEM foram agrupados de acordo com o método das médias das distâncias ou UPGMA e a partir dos grupos formados foram construídos dendrogramas representando as distâncias entre as populações.

Para facilitar a discussão, os diferentes rebanhos serão nomeados por : H1- raça Holandesa, ESALQ; H2- raça Holandesa, EMBRAPA; H3- raça Holandesa, São Roque; N1- raça Nelore, ESALQ; N2- raça Nelore, IZ-Sertãozinho; N3- raça Nelore, Us. São Geraldo; G1- raça Gir, IZ-Rib. Preto; G2- raça Gir, IZ-Sertãozinho; C- raça Caracu.

A Figura 5 mostra o dendrograma obtido a partir do cálculo das DEM entre todos os rebanhos estudados para o loco de kappa-caseína. Podemos observar que dois grupos foram formados, o primeiro contendo os rebanhos das raças Nelore e Gir, e o segundo com rebanhos das raças Holandesa e Caracu.

Dentro do primeiro grupo, os rebanhos N1 e N2 se encontram bastante próximos, com uma DEM de 0,012. O rebanho N3 se encontra mais próximo do rebanho G1 do que de outros rebanhos da mesma raça, sendo que entre os grupos formados pelos rebanhos N1-N2 e N3-G1 existe 2,96% de dissimilaridade. O rebanho G2 foi o que apresentou maior DEM dentro deste grupo, possuindo 8,87% de dissimilaridade para com

FIGURA 5 - Dendrograma das distâncias euclidianas médias para o loco de kappa-caseína entre os rebanhos das raças Nelore (N1, N2, N3); Holandesa (H1, H2, H3); Gir (G1, G2) e Caracu (C).

o grupo formado pelos rebanhos N1-N2-N3-G1. Para o segundo grupo observado neste dendrograma, observamos uma proximidade entre os três rebanhos da raça Holandesa, sendo que os rebanhos H2 e H3 se encontram mais próximos ($DEM=0,0167$), havendo 5,3% de dissimilaridade entre estes e o rebanho H1. Entre o grupo formado por todos os rebanhos da raça Holandesa e a raça Caracu foi obtida uma dissimilaridade de 10,30%.

A DEM calculada para o loco de kappa-caseína permitiu separar os rebanhos de acordo com sua origem, o que resultou na formação de um grupo de animais da espécie *Bos taurus* (raças Holandesa e Caracu) e outro grupo de animais da espécie *Bos Indicus* (raças Nelore e Gir). A DEM entre estes dois grupos mostrou existir 18,89% de dissimilaridade entre eles e portanto aproximadamente 80% de similaridade, considerando-se apenas o loco de kappa-caseína.

O dendrograma obtido para as DEM entre todos os rebanhos para o loco de β -lactoglobulina não possibilitou o agrupamento dos rebanhos de acordo com suas raças ou espécies de origem (Figura 6). Normalmente se espera que rebanhos de uma mesma raça se encontrem mais próximos do que rebanhos de raças diferentes, porém para o loco de β -lactoglobulina este fato ocorreu apenas para os rebanhos H1 e H2 que apresentaram uma DEM de 0,028. Os outros rebanhos estudados, mostraram ter para este loco, maior similaridade com rebanhos de outras raças como pode ser observado pela DEM de 0,044 obtida entre os rebanhos N3 e G1 e 0,0207 entre os rebanhos N2 e C. As DEM obtidas a partir do loco de β -lactoglobulina analisado isoladamente parecem não ser um bom parâmetro na caracterização de populações.

A Figura 7 mostra os agrupamentos obtidos para todos os rebanhos estudados considerando-se os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em conjunto. Pode-se observar que neste caso os rebanhos da raça Holandesa permaneceram agrupados, sendo a DEM entre os rebanhos H2 e H3 de 0,0263 e a distância entre este grupo e o rebanho H1 de 0,0401. O rebanho da raça Caracu, mostrou estar mais próximo dos rebanhos da raça Holandesa do que das demais raças estudadas. As raças zebuínas permaneceram

FIGURA 6 - Dendrograma das distâncias euclidianas médias para o loco de β -lactoglobulina entre os rebanhos das raças Nelore (N1, N2, N3); Holandesa (H1, H2, H3); Gir (G1, G2) e Caracu (C).

FIGURA 7 - Dendrograma da distância euclidiana média para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina entre os rebanhos das raças Nelore (N1, N2, N3); Holandesa (H1, H2, H3); Gir (G1, G2) e Caracu (C).

agrupadas, com exceção do rebanho N1, porém entre as raças Nelore e Gir a DEM entre raças foi menor do que entre rebanhos. O grupo formado pelas raças de origem européia e o grupo formado pelas raças zebuínas com exceção do rebanho N1, apresentaram 14,27% de dissimilaridade considerando-se as DEM para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina, sendo que entre o grupo formado por todas estas raças e o rebanho N1, a DEM foi de 0,1949.

O uso das DEM obtidas a partir dos locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina em conjunto, permitiu um bom agrupamento das raças de acordo com suas espécies, exceto para o rebanho N1, que mostrou o mesmo comportamento observado nas DEM calculadas apenas para o loco de β -lactoglobulina. Dentre as raças européias, a distância entre rebanhos foi menor do que a distância entre raças, o que não ocorreu dentre as raças zebuínas, onde os rebanhos da raça Nelore estiveram mais próximos dos rebanhos da raça Gir.

Analisando as DEM entre raças, obtidas para o loco de kappa-caseína considerado individualmente (Figura 8), observamos que este loco permitiu agrupar as raças de acordo com sua origem (taurina ou zebuína), como ocorreu para a análise das DEM entre rebanhos. As raças Nelore e Gir apresentaram uma DEM de 0,0142 e as raças Holandesa e Caracu uma distância de 0,09. Entre os dois grupos observados, foi obtido um valor de dissimilaridade de 16,45%.

A análise das DEM entre raças para o loco de β -lactoglobulina (Figura 9), assim como ocorreu na análise entre rebanhos, não permitiu agrupar as raças de acordo com sua origem. Neste caso, a menor DEM encontrada foi de 0,031 entre as raças Holandesa e Gir, ficando a raça Nelore a uma DEM de 0,058 das duas anteriores. A raça Caracu mostrou ter para este loco uma dissimilaridade de 14,65% para com as outras raças estudadas.

O estudo dos dois locos em conjunto, permitiu o agrupamento das raças zebuínas, com uma DEM de 0,032 entre elas. A raça Holandesa mostrou possuir maior similaridade com as raças zebuínas (DEM = 0,0925) do que com a raça Caracu, sendo que esta

FIGURA 8 - Dendrograma da distância euclidiana média para o loco de kappa-caseína entre as raças Holandesa, nelore, Gir e Caracu.

FIGURA 9 - Dendrograma da distância euclidiana média para o loco de β -lactoglobulina entre as raças Nelore, Holandesa, Gir e Caracu.

última apresentou maior dissimilaridade (14,18%) para com o grupo formado por todas as outras raças estudadas (Figura 10).

Em uma caracterização genética das raças zebuínas através de polimorfismo protéicos e análise de grupos sanguíneos, DEL LAMA (1991) encontrou em média 2,6% de dissimilaridade entre as raças zebuínas, sendo que entre as raças Nelore e Gir foi obtida uma dissimilaridade de 2,7% para 11 locos estudados. O presente estudo apresentou um valor de dissimilaridade um pouco mais elevado entre as raças Nelore e Gir, provavelmente, devido ao pequeno número de locos estudados e de animais amostrados.

NEI (1976), comenta que os valores de distâncias obtidos entre raças locais situam-se, geralmente, entre 0,00 e 0,05 e entre subespécies ou espécies essa distância aumenta para um intervalo de 0,02 a 0,20. Estes valores concordam com os obtidos para as raças Nelore e Gir, ambas da espécie *Bos indicus*, e entre esta espécie e a raça Holandesa (*Bos taurus*). A raça Caracu, devido a sua origem européia, deveria ter apresentado maior similaridade com a raça Holandesa, o que não ocorreu, provavelmente devido ao fato de que os animais da raça Caracu existentes hoje serem bastante diferentes dos bovinos vindos de Portugal, os quais originaram a raça.

4.4- Considerações Finais

Os alelos **A** e **B** para os genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina foram encontrados em todas as raças estudadas, indicando que provavelmente a mutação causadora deste polimorfismo ocorreu em um ancestral comum a estas raças. ZEUNER(1963) propõe que todos os bovinos tiveram um ancestral comum, denominado *Bos primigenius*, uma espécie bovina extinta a mais de 3.000 anos.

Para as quatro raças estudadas, a frequência do alelo **B** do gene de kappa-caseína se mostrou bastante inferior a frequência obtida para o alelo **A** deste gene. SABOUR et

FIGURA 10 - Dendrograma da distância euclidiana média para os locos de kappa-caseína e β -lactoglobulina entre as raças Nelore, Holandesa, Gir e Caracu.

al (1993), comentam que existem duas hipóteses para explicar a baixa frequência encontrada para o alelo **B** do gene de kappa-caseína em rebanhos da raça Holandesa nos Estados Unidos: a possibilidade desta variante genética ter um efeito deletério na sobrevivência dos bezerros, ou a possível ligação desta variante a um loco indesejado (Tabela 13).

A frequência do alelo **B** do gene de kappa-caseína foi mais alta para a raça Caracu e mais baixa para a raça Gir, ficando a raça Holandesa com uma frequência intermediária entre estas duas (Tabela 13). Este fato sugere que a aptidão leiteira de uma raça parece não ter relação com as frequências dos alelos **A** e **B** do gene de kappa-caseína. É interessante porém observar a diferença obtida para os rebanhos da raça Gir destinados a produção de leite e a produção de carne.

O loco de β -lactoglobulina apresentou frequências mais semelhantes entre os dois alelos estudados do que ocorreu com o loco de kappa-caseína. A raça Caracu apresentou frequências gênicas para este loco bastante próximas de 0,50, enquanto as demais raças apresentaram uma maior frequência para o alelo **B** do gene de β -lactoglobulina do que para o alelo **A** (Tabela 13).

O agrupamento das raças estudadas de acordo com suas espécies foi obtido através dos cálculos de DEM para o loco de kappa-caseína. Este mesmo loco mostrou que mesmo com a heterogenidade obtida entre alguns rebanhos de uma mesma raça, a DEM dentro de raça foi menor do que a DEM entre raças. O cálculo da DEM a partir do loco de β -lactoglobulina não permitiu um bom agrupamento dos rebanhos, de acordo com suas raças, e das raças, de acordo com suas espécies. As DEM obtidas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* foram bastante pequenas, indicando grande similaridade para os locos estudados entre as duas espécies.

A análise de distância genética pode algumas vezes esclarecer a história evolutiva dos grupos estudados, neste caso a distância de Nei é recomendada. Valores pequenos para esta distância traduzem uma divergência recente entre as populações estudadas. Esta afirmação, porém, só é verdadeira desde que as populações tenham evoluído sem

TABELA 13 - Frequências gênicas para os locos de kappa-caseína (K-CN) e β -lactoglobulina (β -LG) para as raças Holandesa, Nelore, Gir e Caracu

RAÇA	FREQ. GÊNICA			
	K-CN		β -LG	
	alelo A	alelo B	alelo A	alelo B
Holandesa (89)	0,81	0,19	0,40	0,60
Nelore (118)	0,92	0,08	0,33	0,67
Gir (83)	0,93	0,07	0,37	0,63
Caracu (79)	0,72	0,28	0,51	0,49

() número de animais genotipados para cada raça

interferência direta do homem (DEL LAMA, 1991). Nas populações de animais domésticos esse tipo de abordagem não pode ser utilizada.

Desta forma, apesar de não refletirem os tempos de divergência entre as raças, os dendrogramas construídos para as quatro raças estudadas ilustram as relações genéticas entre elas. É interessante observar que para os dois locos estudados a divergência genética entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* não foi elevada, contrariando evidências arqueológicas e dados sobre polimorfismo protéicos que parecem apontar um alto grau de divergência genética entre estas espécies (NAIK, 1978; BAKER; MANWELL, 1980).

Utilizando-se como exemplo a raça Jersey, pode-se observar que o loco de kappa-caseína não parece ser um bom indicador da divergência genética. Para esta raça pertencente a espécie *Bos taurus*, a frequência do alelo **B** do gene de kappa-caseína obtida por EENENNAAM; MEDRANO (1991) foi de 0,86, e comparada a frequência de

0,18 obtida para este alelo na raça Holandesa no mesmo estudo, mostra que o uso deste loco isoladamente revelaria uma enorme distância genética entre estas duas raças, bem maior do que a obtida entre diferentes espécies bovinas.

Este trabalho traz mais informações sobre as raças de interesse nacional, principalmente as zebuínas que tem uma grande importância econômica, e são pouco estudadas a nível molecular. A possibilidade ou não do uso dos locos estudados como marcadores moleculares, nas raças Gir, Nelore e Caracu, deve ainda ser investigada através de outros estudos sobre a estrutura destas populações e sobre a influência destes locos em características de produção, como vem acontecendo na raça Holandesa.

5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho e suas intepretações permitem concluir que:

- a)- Os alelos **A** e **B** dos genes de kappa-caseína e β -lactoglobulina estão presentes em todas as raças estudadas. O alelo **B** do gene de kappa-caseína está presente nestas raças com uma frequência bem mais baixa do que o alelo **A** do mesmo gene.
- b)- A raça Holandesa mostrou homogeneidade entre os rebanhos estudados e concordância entre as frequências obtidas e dados da literatura, indicando que o número de animais amostrados é suficiente para representar a raça. Para as raças Nelore, Gir e Caracu, a heterogeneidade existente entre alguns rebanhos, assim como a ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg, mostra que um maior número de animais amostrados seria necessário para uma melhor representação destas raças.
- c)- O melhor agrupamento entre rebanhos da mesma raça, e entre raças da mesma espécie, ocorreu com a utilização de distâncias euclidianas médias, calculadas a partir das frequências gênicas para o loco de kappa-caseína individualmente. O loco de β -lactoglobulina isoladamente, não promoveu um bom agrupamento das raças e rebanhos.

d)- As distâncias genéticas obtidas entre as espécies *Bos indicus* e *Bos taurus*, foi pequena, indicando existência de grande similaridade entre as duas espécies para os locos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L.G.; SCHNEIDER, J.C.; CAROLI, A.; DAVOLI, R.
The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-
production ability. **Journal of Dairy Science**, v. **73**, p. 241-55, 1990.
- ASCHAFFENBURG, R. Review of the progress of dairy science. Section G. Genetic
variants of milk proteins: their breed distribution. **Journal of Dairy Research**, v. **35**,
p. 447-60, 1968.
- BAKER, A.C.M.; MANWELL, C. chemical classification of cattle. 1- breed groups.
Animal Blood Groups Biochemistry Genetics, v. **11**, p. 127-50, 1980.
- BARKER, J.S.F. Population structure. In : HILL, W.G.; MACKAY, T.F.C. **Evolution
and animal breeding**. New York: CAB International, 1989. cap. 11, p. 75-83.
- BELL, K.; MCKENZIE, H.A. β -Lactoglobulins. **Nature**, v. **204**, p. 1275-79, 1964.
- BENINTENDI, R.P.; CARDOSO, V.L.; FREITAS, M.L.R.; BONILHA, L.M.;
GUILHERMINO, M.M.; PIRES, F.L. Índices zootécnicos de um rebanho da raça
Gir em seleção para produção de leite. **Boletim da Industria Animal**, v. **45**, p.
119-31, 1988.

- BONSING, J.; MACKINLAY, A.G. Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. **Journal of Dairy Research**, v. **54**, p. 447-61, 1987.
- BOVENHUIS, H.; ARENDONK, J.A.M.; KORVER, S. Associations between milk protein polymorphisms and production traits. **Journal of Dairy Science**, v. **75**, p. 2549-59, 1992.
- BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo : Associação Brasileira de Estatística, 1990. 105p.
- CAMPOS, B.E.S.; PIRES, F.L.; NASCIMENTO, J. Fatores de meio e de herança que influem sobre a idade à primeira parição nas raças Gir e Guzerá. **Boletim da Indústria Animal**, v. **38**, p. 19-29, 1981.
- COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995 **Palestras Apresentadas**. Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 195-205.
- COWAN, C.M.; DENTINE, M.R.; COYLE, T. Chromosome substitution effects associated with κ -casein and β -lactoglobulin in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. **75**, p. 1097-1104, 1992.
- CROW, J.F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. Nova York: Harper & Row Publs., 1970. 589p.

- DEL LAMA, S.N. Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismos proteicos e grupos sanguíneos. Ribeirão Preto, 1991. 207p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- DeNISE, S.K.; BROWN, D.R.; KHANG, H.M. Applications of molecular genetic technologies to change body composition in beef cattle In: SOUTHWEST NUTRITION AND MANEGEMENTE CONFERENCE, Phoenix, 1993. **Palestras apresentadas**. Phoenix: The University of Arizona, 1993. p. 62-69.
- DOMINGUES, O. **O gado nos trópicos**. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia, 1961. 284p.
- EENENNAAM, A.V.; MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphism in California dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. **74**, p. 1730-42, 1991.
- ERLICH, H.A.; GELFAND, D.H.; SAIKI, R.K. Specific DNA amplification. **Nature**, v. **331**, p. 461-2, 1988.
- FALCONER, D.S. **Introdução a genética quantitativa**. Imprensa universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: Minas Gerais, 1987. 279p.
- FLORES, R.J.; RICHARDSON, T. Genetic engineering of the caseins to modify the behavior of milk during processing: a review. **Journal of Dairy Science**, v. **71**, p. 2640-54, 1988.
- FOX, P.F. **Developments in dairy chemistry**. New York: Elsevier Appl.Sci.Publ., 1982. v. 1, 409p.

- FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DELEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, v. **253**, p. 448-51, 1991.
- GROENEN, M.A.M.; POEL, J.J. Regulation of expression of milk protein genes: a review. **Livestock Production Science**, v. **38**, p. 61-78, 1994.
- HINES, H.C.; HAENLEIN, G.F.W.; ZIKAKIS, J.P.; DICKEY, H.C. Blood antigen, serum protein and milk protein gene frequencies and genetic interrelationships in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. **60**, p. 1143-51, 1977.
- JACOBSEN, H.; KLENOW, H.; OVVARGAARD-HANSEN, K. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. **European Journal of Biochemistry**, v. **45**, p. 623-27, 1974.
- JENNESS, R. Protein composition of milk. In: MCKENZIE, H. **Milk protein, chemistry and molecular biology**. New York :Academic Press, 1971. v. 1, cap. 1, p.17.
- KIDDY, C.A.; JOHNSTON, J.O.; THOMPSON, M.P. Genetic polymorphism in caseins of cow's milk.I- Genetic control of α s1-casein variation. **Journal of Dairy Science**, v. **47**, p. 147-51 , 1964.
- KING, J.W.B. Alan Robertson's contributions to theory and applications of animal improvement. In: HILL, W.G.; MACKAY, T.F.C. **Evolution and animal breeding**. New York: CAB International, 1989. cap 22 p.155-61.

- LARSON, B.L.; GILLESPIE, P.C. **J.Biol.Chem.**, **277**: 565, 1957.
- LASLEY, J.F. **Genetics of livestock improvement**. Englewood cliffs: Prentice-Hall, 1987. 477p.
- LERNER, I.M. **The genetic basis of selection**. New York: John Wiley, 1958. 298p.
- LI, H.F.; GAUNT, S.N. Study of genetic polymorphism of milk β -lactoglobulin, α s1-casein, β -casein and κ -casein in five dairy breeds. **Biochemistry Genetic**, **v. 6**, p. 9-12, 1972.
- LIMA, M.L.P.; BONILHA, L.M.N.; FIGUIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G. Os bovinos da raça Caracu. **Zootecnia**, **v. 30**, p. 01-12, 1992.
- LIN, C.Y.; SABOUR, M.P.; LEE, A.J. Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: a review. **Animal Breeding Abstract**, **v. 60**, p. 1-10, 1992.
- 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 of Dairy Science**, **v. 69**, p. 704-12, 1986.
- LIEN, S.; ALESTROM, P. KLUNGLAND, H.; ROGNE, S. Detection of multiple beta-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS). **Animal Genetics**, **v. 23**, p. 333-8, 1992.

- LIZARDI, P.M.; KRAMER, F.R. Exponential amplification of nucleic acids: new diagnostics using DNA polymerase and RNA replicases. **Trends in Biotechnology**, v. 9, p. 53-8, 1991.
- MACKINLAY, A.G.; WAKE, R.G. Kappa-casein and its attack by rennin (chymosin). In: McKENZIE, H. **Milk protein, chemistry and molecular biology**. New York: Academic Press., 1970 v. 2, p.175.
- MALDONADO, M. **Contribuição para o estudo do gado Caracu**. São Paulo: Pocaí, 1917. 190p.
- MAO, F.C. ; BREMEL, R.D. Prediction of milk yields from serum beta-lactoglobulin concentrations in pregnant heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 291-5, 1995.
- MARTINEZ, M.L.; SANTIAGO, R.L. Nelore selecionado para produção de leite. **Informe Agropecuário**, v. 16, p. 16-18, 1992.
- MARZIALI, A.S.; NG-KWAI-HANG, K.F. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. **Journal of Dairy Science**, v.69, p. 1793-8, 1986.
- McLEAN, D.M.; GRAHAM, E.R.B.; PONZONI, R.W.; McKENZIE, H.A. Effects of milk protein genetic variants on milk and composition. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 531-37, 1984.
- McMEEKIN, T.L. Milk proteins in retrospect. In: McKENZIE, H. **Milk proteins chemistry and molecular biology**. New York: Academic Press, 1970. v. 1, p. 03.

- MEDRANO, J.F.; CORDOVA, E.A. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. **Bio/Technology**, v. 8, p. 144-6, 1990a.
- MEDRANO, J.F.; CORDOVA, E.A. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. **Animal Biotechnology**, v. 1, p. 73-7, 1990b.
- MC MEEKIN, T.L. Milk proteins in retrospect. In: McKENZIE, H. A. **Milk proteins chemistry and molecular biology**. New York: Academic Press, 1970. v. 1, p. 03.
- MIRANDA, G.; ANGLADE, P.; MAHÉ, M.F.; ERHARDT, G. Biochemical characterization of the bovine genetic kappa-casein C and E variants. **Animal Genetics**, v. 24, p. 27-31, 1993.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, p. 36-42, 1990.
- NAIK, S.N. Origin and domestication of zebu cattle (*Bos indicus*). **Journal of Human Evolution**, v. 7, p. 23-30, 1978.
- (NTIS) NATIONAL TECHNICAL INFORMATION SERVICE. Impacts of applied genetics In: **Congress of technology assessment**, 1981. 324p.
- NEI, M. Mathematical models of speciation and genetic distance. In: KARLIN, S.; NEVO, E. **Population genetics and ecology**. New York : Academic Press, 1976. p.723-65.

NEELIN, J.M. Variants of kappa-casein revealed by improved starch gel electrophoresis.

Journal of Dairy Science, v. 47, p. 506-9, 1964.

NG-KWAI-HANG, K.F.; ZADWORNÝ, D.; HAYES, J.F.; KUHNLEIN, U.

Identification of kappa-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. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2410-15, 1991.

NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E.; MONARDES, H.G. Variation

in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 563-70, 1987.

NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E.; MONARDES, H.G.

Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein production by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 835-40, 1984.

NOWAK, R.M.; PARADISO, J.L. **Walker's mammals of the world**. Baltimore : Johns

Hopkins Univ. Press, 1983. v. 2, p. 1232-1255.

OSBORNE, T.B.; WAKEMAN, A.J. Some new constituents of milk. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 33, p. 243, 1918.

OU, C.Y.; KWOK, S.; MITCHELL, S.W.; MACK, D.H.; SNINSKY, J.J.; KREBS,

J.W.; FEORINO, P.; WARFIELD, D.; SCHOCHETMAN, G. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. **Science**, v. 239, p. 295-7, 1988.

PEREIRA, J.C.C. O Caracu Caldeano. **Informe Agropecuário**, v. 16, p. 15-16, 1992.

- PHILLIPS, R.W.; JOSHI, N.R. **El ganado cebu de la India y del Pakistan**. Roma: FAO, 1954. 256p.
- POLLEVICK, G.D.; GIAMBIAGI, S.; MANCARDI, S.; DeLUCA, L.; BURRONE, O. FRASCH, A.C.C.; UGALDE, R.A. Sex determination of bovine embryos by restriction fragment polymorphisms of amplified ZFX/ZFY loci. **Bio/Technology**, v. **8**, p. 499-506, 1992.
- RAMSDELL, G.A. WHITTIER, E.O. Composition of casein in milk. **Journal of Biological Chemistry**, v. **154**, p. 413-16, 1944.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L.; ROSA, A.J.M. Polimorfismo de um microssatélite do gene IGF-1 em bovinos da raça Canchim In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41 , Caxambú, 1995 **Trabalhos apresentados**. Caxambú: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p 197.
- RODRIGUES, C.V.; LIMA, R.M.G.; GUIMARÃES, S.E.F.; SANTOS, S.R.Q.; PINHEIRO, L.E.L. Uso de marcadores de DNA em bovinos criados no Brasil. **Revista Brasileira de Genética**, v. **17** (Supl. 3), p. 198, 1994.
- RON, M.; YOFFE, O.; MEDRANO, J.F.; WELLER, J.I. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. **77**, p. 1106-13, 1994.
- SABOUR, M.P.; KEOUGH, C.Y.; MECHANDA, S.M.; LEE, A.J. Effects of selection practiced on the frequencies of kappa-casein and β -lactoglobulin genotypes in

Canadian artificial insemination bulls. **Journal of Dairy Science**, v. **76**, p. 274-80, 1993.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. **239**, p. 487-91, 1988.

SAIKI, R.K.; SCHARI, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of γ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. **230**, p. 1350-4, 1985.

SANTIAGO, A.A. **Os cruzamentos na pecuária bovina**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1975. 549p.

SCHAAR, J. Effects of kappa-casein variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. **Journal of Dairy Research**, v. **51**, p. 397-406, 1984.

SCHMIDT, D.G. Association of casein and casein micelle structure. In: FOX, P.F. **Developments in dairy chemistry**. New York : Appl. Sci. Publ., 1982. v. I, p. 61.

SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; ACKERMANN, M.R.; GILBERT, R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proc. of Natural Academic Science**, v. **89**, p. 9225-9, 1992.

SMITH, C.A.B. Counting methods in genetical statistics. **Ann. Human Genetics**, v. **21** p. 254-76, 1977.

- STERN, C. The hardy-Weinberg law. **Science**, v.97 p.137-8, 1943.
- SULLIVAN, R.A.; FITZPATRICK, M.M.; STATON, E.K. Distribution of kappa-casein in skim milk. **Nature**, v. 183, p. 616-19, 1959.
- SWAISGOOD, H.E. Chemistry of milk protein. In: FOX, P.F. **Developments in dairy chemistry**. New York: Appl. Sci. Publ., 1982. v. 1, p. 1.
- SWAISGOOD, H.E. Primary sequence of kappa-casein. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p.583-91, 1975.
- TEE, M.K.; MORAN, C.; NICHOLAS, F.W. Genotyping of the A and B variants of cattle beta-lactoglobulin using restriction lenght polymorphisms. In: AUSTRALASIAN GENE MAPPING WORKSHOP, Sidney, 1990. **Prooceedings**. Sidney: Macquarie University, 1990. p.62.
- THOMPSON, M.P. α s- and β -caseins. In: McKENZIE, H. **Milk proteins chemistry and molecular biology**. New York: Academic Press, 1970. v. 2, p. 117.
- TORRES, A.D.P.; JARDIM, W.R. **Manual de zootecnia**: raças que interessam ao Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 1975. 299p.
- UNANIAN, M.M.; DeNISE, S.K.; ZHANG, H.M.; AX, R.L. Polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism in the *bovine growth hormone* gene. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2203, 1994.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis, methods for discrete population genetic data**. Massachusetts : Sinauer Associates, 1990. 377p.

WELLER, J.I.; KASHI, Y. SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for mapping quantitative traits in dairy cattle using genetic markers. **Journal of Dairy Science**, v. **73**, p. 2525-37, 1990.

ZADWORNÝ, D.; KUHNLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical Applied Genetics**, v. **80**, p. 631-4, 1990.

ZHANG, H.M.; BROWN, D.R.; DeNISE, S.K.; AX, R.L. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine *somatotropin* gene. **Journal of Animal Science**, v. **71**, p. 2276, 1993.

ZEUNER, F.E. **A history of domesticated animals**. London : Hutchinson, 1963. 240p.