

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Avaliação do efeito do polimorfismo dos genes da kappa-caseína sobre a composição do leite de búfala em uma população criada no município de Moju-PA¹

Marco Antonio Paula de Sousa², Alyne Cristina Sodré Lima³, Paula Fabriny Maués da Silva⁴, Adriana Corrêa de Souza Teixeira⁵, Luciara Celi da Silva Chaves⁶, Alex Sandro Schierholt⁶

¹Trabalho financiado pela Fapespa

²Graduação em Zootecnia – UFRA, Belém. Bolsista PROEX. e-mail: sousa.map@gmail.com

³Graduação em Zootecnia – UFRA, Belém. Monitora da disciplina de Melhoramento genético animal. email: alyneslima@gmail.com

⁴Graduação em Zootecnia – UFRA, Belém. email: fabrinymaues@gmail.com

⁵Mestranda em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - UFRA

⁶Prof. Dr. da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA email: luciaracelichaves@yahoo.com.br; alexgenetica@yahoo.com.br

Resumo: Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do polimorfismo do gene da kappa-caseína sobre a composição do leite de búfalas leiteiras. O estudo foi conduzido no município de Mojú, no período de 2008 a 2011. Utilizaram-se 246 registros de produção de leite referentes a 1ª lactação de 45 búfalas. O fragmento alvo foi o éxon IV do gene da kappa-caseína, utilizando primers confeccionados originalmente para bovinos, e posteriormente sequenciados. Os resultados do sequenciamento revelando um polimorfismo no códon 135 e no 136. Houve efeito dos diferentes genótipos do gene da kappa-caseína sobre a produção de leite e produção de Mozzarella, fato não observado para os constituintes do leite. Houve efeito dos diferentes genótipos do gene da kappa-caseína sobre a produção de leite e produção de *Mozzarella*, há necessidade da condução de mais experimentos associando mutação encontrada com características economicamente importantes.

Palavras-chave: composição do leite, búfalas leiteiras, proteínas do leite, queijo, sequenciamento

Effect of polymorphism of genes of kappa-casein on the composition of buffalo milk in a population established in the municipality of Moju-PA

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of gene polymorphism of kappa-casein on milk composition of dairy buffaloes. The study was conducted in the municipality of Mojú, from the period 2008-2011. We used 246 records of milk production related to 1st lactation of 45 buffaloes. The target fragment was exon IV of the kappa-casein gene using primers originally made for cattle, and subsequently sequenced. The results of sequencing revealed a polymorphism at codon 135 and 136. There were effects of the genotypes of the gene of kappa-casein on the production of milk and production of *Mozzarella* was not observed for milk constituents. There were effects of the genotypes of the gene of kappa-casein on the production of milk and production of *Mozzarella* is no need to conduct further experiments involving mutation found in economically important traits.

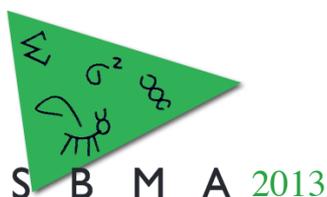
Keywords: cheese, buffalo milk, composition of milk, milk proteins, sequencing

Introdução

É incontestável a importância que a atividade leiteira possui no Brasil, e o maior conhecimento das potencialidades e características produtivas dos búfalos permitem que a bubalinocultura leiteira se destaque em diversas regiões do país.

A produtividade leiteira dos bubalinos que confere a atividade viabilidade econômica, é decorrente da rusticidade da espécie e da capacidade de aproveitamento de forragem de inferior qualidade além da característica de resistência às mais adversas condições climáticas e doenças. Mas estimativas apontam que apenas uma pequena parte do rebanho nacional é utilizado para produção de leite.

O leite bubalino é, normalmente, destinado à fabricação de queijos (*Mozzarella*), que apresentam coloração branca, textura macia e sabor suave. A Kappa-caseína é uma proteína do leite com função específica de determinar o tamanho das micelas do leite e é polimórfica em todas as raças leiteiras, sendo



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

assim, o estudo de polimorfismo no genoma busca associações entre genótipos das proteínas do leite e características economicamente importantes em gado leiteiro, como a produção de leite, a composição do leite e produção de queijo.

Considerando que os estudos sobre a produção e qualidade do leite bubalino de rebanhos criados na Amazônia são incipientes, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do polimorfismo do genes da kappa-caseína (CSN3K) sobre a produção e composição do leite de búfala.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido em quatro propriedades localizadas no município de Mojú, na Mesorregião do Baixo Tocantins, Estado do Pará, no período de 2008 a 2011.

Utilizaram-se 246 registros de produção de leite referentes a 1ª lactação de 45 búfalas de diferentes grupamentos genéticos, em sua maioria matrizes da raça Murrah (*Bubalus bubalis* L.) ou mestiças com predominância genética Murrah, controladas de março de 2009 a novembro 2011, pertencentes a dois rebanhos localizados no Nordeste do Pará. A extração de DNA foi feita utilizando o Purelink Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen, seguindo protocolo indicado pelo fabricante. A extração de DNA e quantificação das amostras foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, 0,5 µM de cada primer direto (forward) e reverso (reverse), 1X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂ e 50mM KCl), 100 µM de dNTP e 1U de Taq polimerase. O fragmento alvo foi o éxon IV do gene da kappa-caseína. Os primers utilizados foram originalmente sintetizados baseados na sequência de nucleotídeos de bovinos conforme descrito por Mitra et al (1998). Os produtos de PCR purificados foram enviados para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP, Campus Jaboticabal), onde os fragmentos foram sequenciados utilizando o sequenciador Applied Biosystems-ABI 377.

As sequências geradas pelo sequenciamento foram editadas utilizando o software ChromasPro (Technelysium Pty Ltd) e analisadas por meio de BLAST utilizando o programa ClustalX.

As variáveis em estudo produções no dia de controle (medidas repetidas durante a lactação), foram submetidas à análise de variância conforme o modelo unicaracterístico:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Efeito}_j + e_{ij}$$

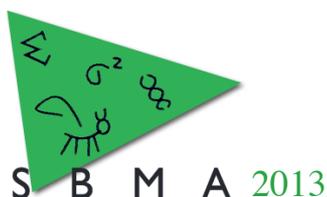
em que: Y_{ij} é a produção da variável em questão (Produção de leite, percentagem de Gordura, Proteína, Lactose, extrato seco desengordurado, Sólidos Totais e Produção de *Mozzarella*) do i -ésimo animal relativa ao j -ésimo efeito; μ é a média de produção da variável; Efeito_j é o efeito fixo da j -ésima classe e; e_{ij} é o erro aleatório relacionado cada observação. O efeito de interesse considerado foi: genótipo.

Para comparação dos níveis de cada variável classificatória quando esta influenciar a variável resposta, foi adotado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Todas as análises foram feitas utilizando-se o procedimento PROC MIXED do pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute IC., 2002, versão 9.2).

Resultados e Discussão

Os resultados mostram a existência de polimorfismos no fragmento alvo do gene da kappa-caseína nos búfalos Murrah e mestiços da população estudada. Os resultados do sequenciamento revelaram um polimorfismo no códon 135, evidenciando animais heterozigotos que apresentaram tanto cromossomos com a presença de citosina no segundo nucleotídeo do códon (ACC), codificando treonina, como cromossomos apresentado timina em substituição a este mesmo nucleotídeo (ATC), codificando isoleucina. Outro polimorfismo foi evidenciado no terceiro nucleotídeo do códon 136, com animais apresentando citosina e timina neste sítio (ACC/ACT), que contudo, não gerou mudança na sequência de aminoácidos da proteína. Resultados similares foram relatados por Mitra et al. (1998).

Foi observado efeito dos diferentes genótipos para kappa-caseína (Tabela 1) sobre a produção de leite e produção de *Mozzarella*, sendo os animais heterozigotos (genótipo 2) os que apresentaram um melhor desempenho (produção média de leite de 3,57 kg) enquanto os animais homozigoto (genótipo 1)



XSimpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

apresentaram média de produção de 2,67 kg . Contudo, não foi observada diferença para os constituintes do leite (gordura, proteína, lactose, ESD, sólidos totais).

Estudos relacionando a produção de leite como o polimorfismo do gene da kappa-caseína em búfalos são raros. Entretanto, é conhecida a associação do genótipo para a kappa-caseína com a produtividade ($P < 0,05$) em bovinos nas raças Girolando e Holandesa (STIPP et al., 2013). A participação da kappa-caseína na composição proteica do leite justifica novas pesquisas sobre a correlação deste polimorfismo com a produção de leite e de queijo.

Mesmo existido grande similaridade genética entre búfalos e bovinos, Fox e McSwenney (2003) afirmam que não há um consenso na literatura sobre a influência dos alelos do gene sobre a produtividade leiteira.

Tabela 1. Efeito do polimorfismo genético no gene da kappa-caseína sobre a composição do leite de búfala

Variável	N	Genótipo
Produção de leite (kg)	224	$p < 0,05$ (0.0028)
Gordura (%)	180	NS
Proteína (%)	179	NS
Lactose (%)	180	NS
Extrato Seco Desengordurado (%)	180	NS
Sólidos Totais (%)	180	NS
Produção de Mozzarella (kg)	180	$p < 0,05$ (0.0008)

N = número de observações;

NS = não significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Conclusões

Os resultados deste trabalho confirmam a presença de polimorfismos no gene da kappa-caseína em búfalos leiteiros. Houve efeito dos diferentes genótipos do gene da kappa-caseína sobre a produção de leite e produção de *Mozzarella*, há necessidade da condução de mais experimentos associando mutação encontrada com características economicamente importantes.

Literatura citada

- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced dairy chemistry: proteins**. 3. ed. New York: Kluwer Academic, 2003. v.1. 740p.
- MITRA, A.; SCHLEE, P.; KRAUSE, I.; BLUSCH, J.; WERNER, T.; BALAKRISHNAN, C. R.; PIRCHNER, F. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo: A new genetic variant in buffalo. **Animal Biotechnology**, v.9, p. 81-87, 1998.
- STIPPI, A.T.; BIGNARDII, P.R.; POLI-FREDERICOI, R.C.; K. SIVIERIII; COSTA, M.R. Polimorfismos genéticos da kappa-caseína e da beta-lactoglobulina e produção de leite em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p. 275-280, 2013