

Genetski polimorfizam β -laktoglobulina i κ -kazeina pasmina goveda u Hrvatskoj

Ante Ivanković^{1*}, Jelena Ramljak¹, Admir Dokso²,
Nikolina Kelava¹, Miljenko Konjačić¹, Saša Paprika¹

¹Zavod za specijalno stočarstvo, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet,
Svetošimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska

²Institut za zootehniku, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet,
Zmaja od Bosne 8, Sarajevo, BiH

Prispjelo - Received: 21.7.2011.
Prihvaćeno - Accepted: 18.11.2011.

Sažetak

Učinkovita proizvodnja mlijeka uvažava interese proizvođača, preradbene industrije, potrebe potrošača i dobrobiti životinje. Razvoj novih metoda direktne analize gena odgovornih za polimorfizam bjelančevina mlijeka daje nove alate u podizanju profitabilnosti proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda kroz ugradnju pasminskog genetskog profila u gojdbeni program. Radi nužnosti determinacije genetskog profila pasmina goveda u Hrvatskoj, koristeći nove analitičke metode određen je udio dominantnih alelnih polimorfni varijanti beta-laktoglobulina (β -Lg) i kapa-kazeina (κ -CN). Udio alelna B varijante beta-laktoglobulina dominantan je u svim istraženim pasminama goveda (>52,9 %). Alelna A varijanta kapa-kazeina je dominantna u selekcioniranim pasminama goveda (60,7-76,4 %), dok je udio B varijante kapa-kazeina značajno zastupljeniji u izvornim pasminama goveda (48,2-84,1 %). Spoznaje o genetskom profilu pasmina obzirom na istražene polimorfne varijante bjelančevina mlijeka su korisne u daljnjoj uzgojnoj izgradnji i gospodarskoj afirmaciji, posebice izvornih pasmina goveda.

Ključne riječi: govedo, bjelančevine mlijeka, polimorfizam

Uvod

Polimorfizam bjelančevina mlijeka uočen je prije više od pola stojeća, od kada se uz razvoj analitičkih metoda provode istraživanja polimorfni varijanti, njihove povezanosti s laktacijskim odlikama, te determiniranje gena odgovornih za njihovu pojavnost. Razvoj metode lančane reakcije polimeraze (*engl.* Polymerase chain reaction; PCR) omogućio je identifikaciju polimorfizma bjelančevina mlijeka neposredno na kodogenoj sekvenci odgovornog gena, neovisno o spolu, dobi ili sekreciji mlijeka jedinke. Raniji interes preradbene industrije potaknut zapažanjima o učincima određenih gena/genotipova na laktacijske odlike i iskoristivost mlijeka u preradi potiče daljnja istraživanja učinaka ekspresije odgovornih gena, te favoriziranje poželjnih varijanti gena kroz neposrednije uključivanje u uzgojne programe. De-

terminiranje genetskog profila komercijalnih i izvornih populacija goveda osnova su njihovog sustavnog gojdbenog i reafirmacijskog usmjeravanja.

Polimorfizam bjelančevina β -laktoglobulina (β -Lg) i kapa kazeina (κ -CN) ugrađen je u suvremene uzgojne programe goveda kroz koje se nastoje funkcionalno unaprijediti populacije. Kao glavna bjelančevina sirutke mlijeka β -Lg je determiniran genom pozicioniranim na 11. kromosomu goveda. Caroli i sur. (2009) uz dva dominantna polimorfna oblika (A i B) ukazuju i na devet rijetkih polimorfni varijanti (C, D, E, F, G, H, I, J, W). Polimorfni oblik β -Lg A osobit je po aminokiselinama Asp i Val na pozicijama 64. i 118., dok je obliku β -Lg B na istim pozicijama svojstven Gly i Ala (Eigel i sur., 1984). Kapa kazein (κ -CN) kao jednu od četiri kazeinske bjelančevine mlijeka određuje gen pozicioniran na 6. kromosomu

*Corresponding author/Dopisni autor: E-mail: aivankovic@agr.hr

goveda. Caroli i sur. (2009) navode četrnaest polimorfni oblika κ -CN (A, A¹, B, B², C, D, E, F¹, F², G¹, G², H, I, J) od kojih su dva polimorfna oblika pojavnošću dominantna (A i B). Polimorfnom κ -CN A obliku svojstvene su aminokiseline Thr i Asp na poziciji 136. i 148., dok je κ -CN B obliku na istim pozicijama svojstven Ile i Ala (Eigel i sur., 1984).

Brojnim istraživanjima nastojale su se utvrditi veze između polimorfni alelni varijanti β -Lg i κ -CN te laktacijskih odlika i preradbenih karakteristika mlijeka (Antunac i sur., 1991). Istraživanjima je potvrđen pozitivan učinak AA genotipa β -Lg na mliječnost (Ikonen i sur., 1999b; Caroli i sur., 2004), premda bilježimo istraživanja koja prednost daju AB genotipu β -Lg (Tsiaras i sur., 2005; Karimi i sur., 2009). Novijim proučavanjima potvrđen je povoljan učinak BB genotipa β -Lg na udio mliječne masti (Tsiaras i sur., 2005; Balcan i sur., 2007; Karimi i sur., 2009), udio kazeina u mlijeku (Braunschweig i sur., 2000), ukupni udio bjelančevina (Balcan i sur., 2007) i veći prinos sira (Lunden i sur., 1997; Strzalkowska i sur., 2002), što je od osobitog interesa za prerađivačku industriju.

U većini novih istraživanja uočen je pozitivan učinak B alelni varijante κ -CN na udio kazeina i ukupni bjelančevina u mlijeku (Ikonen i sur., 1999a; Kučerova i sur. 2006; Molina i sur., 2006a; Comin i sur., 2008; Sitkowska i sur., 2008) i laktodinamografske odlike mlijeka (Rahali i Ménard, 1991; Snoj i sur., 1991). Osim toga, mlijeko κ -CN haplotipa BB iziskuje kraće vrijeme sirenja (Lunden i sur., 1997; Kübarsepp i sur., 2005), daje veći prinos sira s većim udjelom bjelančevina (Ikonen i sur., 1999b; Braunschweig i sur., 2000; Ng-Kwai-Hang i sur., 2002; Miciikiene i sur., 2005; Molina i sur., 2006b). Visok sadržaj bjelančevina i mliječne masti u mlijeku pozitivno utječe na kvalitetu, teksturu i randman sira, a koagulacijska svojstva mlijeka pod neposrednim su utjecajem udjela bjelančevina u mlijeku i odnosa kazeina naspram ukupni bjelančevina (kazeinski broj). Ikonen i sur. (1999b) uočavaju da je B alel κ -CN povezan s poželjnim koagulacijskim svojstvima, dok Czerniawska-Piątkowska i sur. (2004) navode da B alelna varijanta κ -CN skraćuje vrijeme koagulacije od 10 do 30 %. Sulimova i sur. (2007) potvrđuju važnost determinacije κ -CN gena u uzgojnoj izgradnji populacija goveda, te značajne ekonomske učinke.

Cilj ovoga istraživanja je determinacija frekvencija dominantni polimorfni varijanti β -Lg i κ -CN u populacijama goveda u Hrvatskoj radi njihovog uzgojnog usmjeravanja, evaluacije njihovih komparativni prednosti i daljnje uzgojne izgradnje.

Materijal i metode

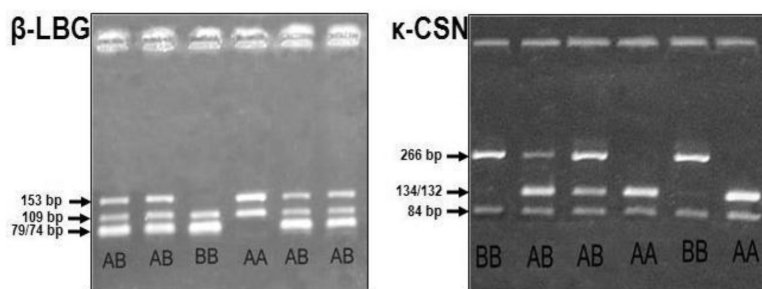
U istraživanje su uključene tri alohtone i tri izvorne pasmine goveda nazočne na području Hrvatske i to: holštajn (130 jedinki), simentalaska (100 jedinki), smeđe govedo (70 jedinki), buša (30 jedinki), slavonsko-srijemski podolac (30 jedinki) i istarsko govedo (30 jedinki). Uzorci tkiva (dlaka, krv) simentalaska pasmine i slavonsko-srijemskog podolca prikupljeni su na području Zagrebačke i Koprivničko-križevačke županije, za holštajn pasminu na području Osječko-baranjske županije, za smeđe i istarsko govedo na području Istarske županije, te za bušu na području Dubrovačko-neretvanske i Ličko-senjske županije. Uzorci tkiva su nakon prikupljanja čuvani na -20 °C do izolacije DNA koja je učinjena pomoću izolacijskog kita Sigma-Aldrich™ GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (www.sigma-aldrich.com). Izolirana DNA je do provedbe postupka genotipizacije pohranjena na -20 °C.

Uz pomoć lančane reakcije polimeraze (PCR) učinjeno je umnažanje ciljanih kodogenih DNA regija gena odgovornih za pojavnost polimorfizma β -Lg i κ -CN. Za umnažanje kodogenih regija gena β -Lg i κ -CN uporabljene su začetne oligonukleotidne sekvence (tablica 1). Umnažanje kodogene sekvence eksona IV β -Lg gena (dužine 262 bp) i eksona IV κ -CN gena (dužine 350 bp) učinjeno je u 20 μ L reakcijskoj smjesi (13,22 μ L MiliQ voda; 2,0 μ L 10 \times PCR pufer; 1,2 μ L 25 mM MgCl₂; 0,38 μ L 10 mM dNTP; 1,0 μ L svakog začetnog oligonukleotida, 1,1 μ L uzorka DNA; 0,1 U Taq Polymerase). Lančana reakcija polimeraze učinjena je na uređaju Thermal Cycler MJ Research PTC 100 prema temperaturnom programu po kojem je nakon inicijalne denaturacije (94 °C/4 min), slijedilo 35 ciklusa umnažanja DNA isječka (94 °C/60 sec, 60 °C/30 sec, 72 °C/30 sec) te završno finalno prilijeganje (72 °C/10 min). Provjera kvalitete PCR reakcije učinjeno je na 1 % agaroznom gelu nakon bojenja etidijevim bromidom (EtBr).

Identifikacija A i B alelni varijanti β -Lg i κ -CN obavljena je u dva koraka prema protokolu Medra-

Tablica 1. Začetne oligonukleotidne sekvence i enzimi korišteni u genotipizaciji β -Lg i κ -CN pasmina goveda

Gen	Začetne oligonukleotidne sekvence	Enzim	Mjesto restrikcije
β -Lg	5'-GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA-3' 5'-GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA-3' (GenBank Acc.No. X14712)	HaeIII	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↑GG...5'
κ -CN	5'-ATCATTATGGCCATTCCACCAAAG-3' 5'-GCCATTTCGCCTTCTCTGTAACAGA-3' (GenBank Acc.No. X14908)	HinfI	5'...G↓ANTC...3' 3'...CTNA↑G...5'

Slika 1. Identifikacija genotipova β -Lg i κ -CN na 3 % agaroznom gelu

no i Aguilar-Cordova (1990). Prvi korak je cijepanje PCR produkta, sekvence kodogene regije β -Lg restriksijskom endonukleazom HaeIII u trajanju 2 h/37 °C u priređenoj reakcijskoj smjesi (4,89 μ L dH₂O; 2,25 μ L pufer C, 15 μ L PCR produkta; 0,36 μ L HaeIII). Za cijepanje PCR produkta sekvence kodogene regije κ -CN korištena je restriksijska endonukleaza HinfI u trajanju 2 h/37 °C u reakcijskoj smjesi (3,86 μ L MiliQ voda; 1,0 μ L pufer R, 5 μ L PCR produkta; 0,13 μ L HinfI). Rezultati cijepanja restriksijskim enzimima direktno su očitani na 3 % agaroznom gelu nakon elektroforeze (50 min) i bojanja gela s EtBr (slika 1). Genotipovi β -Lg determinirani su na osnovu broja/veličine DNA fragmenta: AA (153, 109 bp), AB (153, 109, 79/74 bp) i BB (109, 79/74 bp). Genotipovi κ -CN također su određeni temeljem broja/veličine cijepanih DNA fragmenta: AA (134/132, 84 bp), AB (266, 134/132, 84 bp) i BB (266, 84 bp). Izračun frekvencija alelnih varijanti, uočena i očekivana razina heterozigotnosti (H_O , H_E), odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže i F-statistika (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) urađeni su programskim paketom Genepop v3.4 (Raymond i Rousset, 1995).

Rezultati i rasprava

Determinacijom polimorfizma β -Lg utvrđena je dominacija alelna B varijante β -Lg u svim istraživanjem obuhvaćem pasminama (tablica 2). U populaciji slavonsko-srijemskog podolca utvrđena je samo alelna B varijanta β -Lg, dok je alelna B varijanta β -Lg u populaciji istarskog goveda značajno zastupljenija naspram drugih populacija s utvrđenim polimorfizmom. Udio A varijante β -Lg najveći je u populaciji buše, premda značajno ne odstupa od frekvencija alela utvrđenih u populacijama holštajna, simentalca i smeđeg goveda.

U komercijalnim populacijama simentalca, holštajna i smeđeg goveda utvrđen je značajan višak heterozigota (18,5 do 37,5 %). Pretpostavlja se da je uočeni višak heterozigota posljedica preferiranja homozigotnih bikova na "poželjnog" polimorfnog alelnog B oblika β -Lg. U prilog tome je i zapažanje većeg udjela BB genotipa β -Lg u navedenim pasminama.

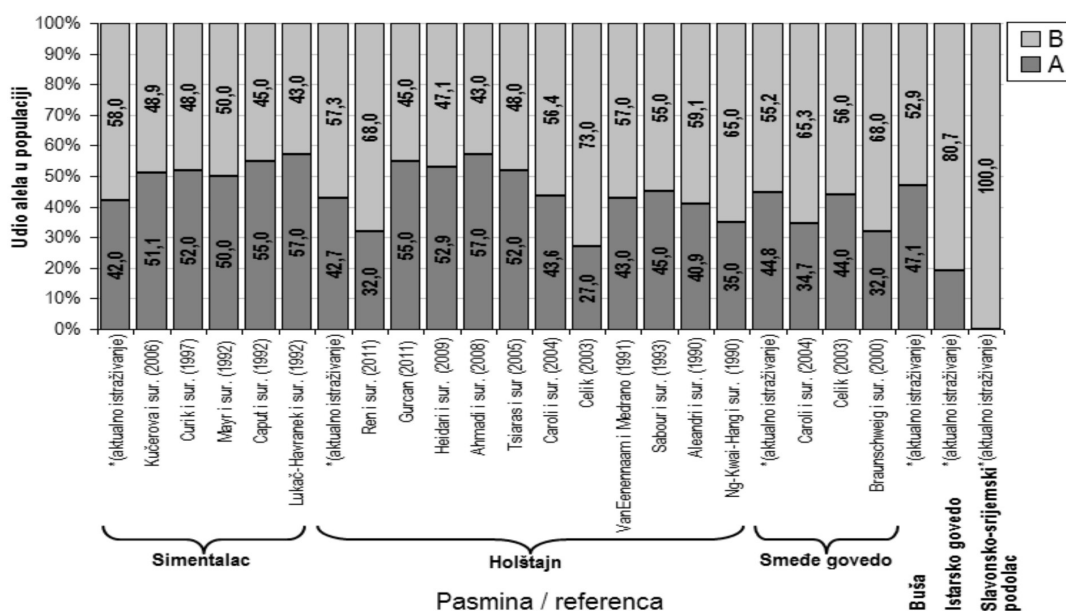
U populaciji buše utvrđen je višak homozigota (29,2 %), što je posljedica "genetskog uskog grla", fragmentiranost populacije ili odraz provedbe novog

Tablica 2. Frekvencija genotipova i alelnih varijanti β -Lg, uočena i očekivana heterozigotnost (H_O , H_E) i indeks fiksacije (F_{IS}) u istraženim pasminama goveda

	Frekvencija genotipova			Frekvencija gena		H_O	H_E	F_{IS}
	Lg ^{AA}	Lg ^{AB}	Lg ^{BB}	Lg ^A	Lg ^B			
Simentalska	8,49	66,98	24,53	0,420	0,580	0,669	0,489	-0,375
Holštajn	13,01	59,35	27,64	0,427	0,573	0,593	0,491	-0,213
Smeđe govedo	15,52	58,62	25,86	0,448	0,552	0,586	0,499	-0,185
Buša	29,41	35,29	35,29	0,471	0,529	0,352	0,506	0,292
Slavonsko-srijemski podolac	-	-	100,00	-	1,000	-	-	-
Istarsko govedo	3,23	32,26	64,52	0,193	0,807	0,323	0,317	-0,033

uzgojnog/konzervacijskog programa, što može proizročiti genetsku neravnotežu. U odnosu na ranija istraživanja frekvencija alelnih varijanti β -Lg simentalčke pasmine u Hrvatskoj (Caput i sur., 1992; Lukač-Havranek i sur., 1992; Curik i sur., 1997), uočava se značajno povećanje udjela alelna B varijante β -Lg (grafikon 1). Pretpostavlja se da je ovakvo povećanje rezultat značajne imigracije gena iz drugih subpopulacija kroz uvoz sjemena bikova definiranog poželjnijeg genotipa β -Lg. U populaciji holštajna također dominira alelna B varijanta β -Lg, što je osobito i za većinu ranije istraženih populacija. Zastupljenost alelna B varijante β -Lg u populaciji smeđeg goveda u Hrvatskoj gotovo je identična udjelima alelnih varijanti koje je utvrdio Celik (2003), no veća u odnosu na druga istraživanja (Braunschweig i sur., 2000;

Caroli i sur., 2004). Dominacija alelna B varijante β -Lg u ugroženim izvornim podolskim pasminama goveda povoljna je okolnost glede njihove gospodarske afirmacije u proizvodnji mliječnih proizvoda (sira, mliječnih namaza ili fermentiranih napitaka). Istarsko govedo pored značajne gospodarske reafirmacije u proizvodnji kvalitetnog govedeg mesa, potrebno je zaštititi i kroz programe proizvodnje mliječnih proizvoda. U populaciji buše uravnotežen je udio obaju alelnih polimorfni varijanti β -Lg što može biti smjernica u afirmaciji pasmine kroz plasman konzumnog mlijeka ili mliječnih proizvoda. Ranija istraživanja su uočila da alelna A varijanta β -Lg ima pozitivna učinak na mliječnost (Ikonen i sur., 1999b; Caroli i sur., 2004) dok je B alelna polimorfna varijanta β -Lg povezana s povoljnijim udjelom mliječne masti (Ng-



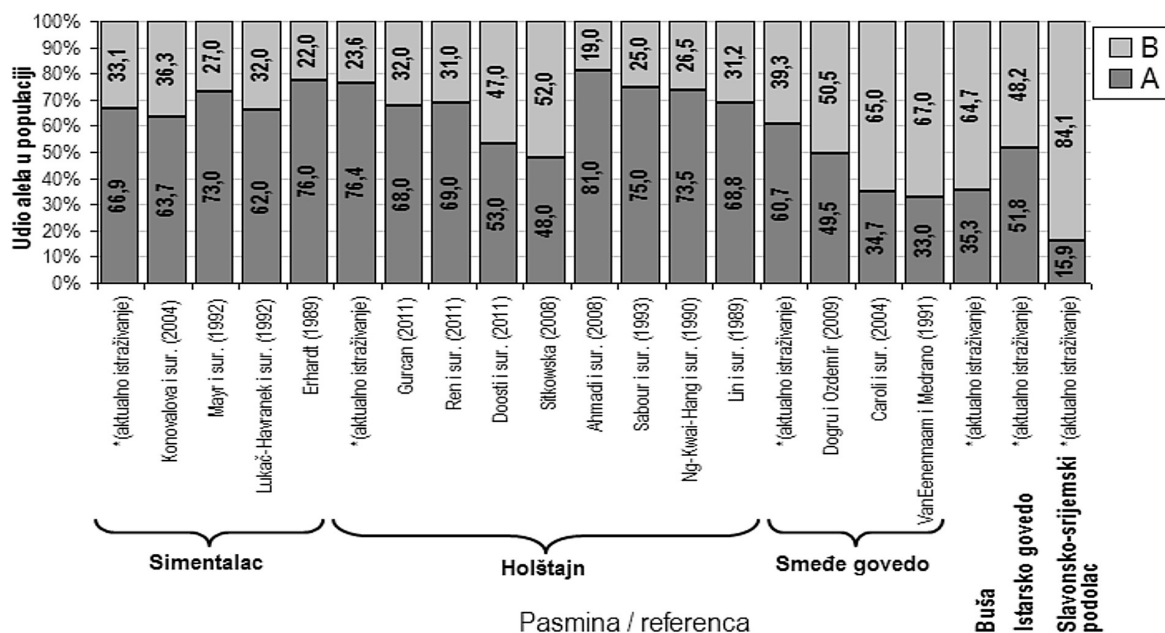
Grafikon 1. Udio alelnih varijanti β -Lg u pasminama goveda (različiti literaturni izvori)

Tablica 3. Frekvencija genotipova i alelnih varijanti κ -CN, uočena i očekivana heterozigotnost (H_O , H_E) i indeks fiksacije (F_{IS}) istraženih pasmina goveda

	Frekvencija genotipova			Frekvencija gena		H_O	H_E	F_{IS}
	CN ^{AA}	CN ^{AB}	CN ^{BB}	CN ^A	CN ^B			
Simentalac	42,65	48,53	8,82	0,669	0,331	0,485	0,446	-0,096
Holštajn	62,86	27,14	10,00	0,764	0,236	0,271	0,363	0,247
Smeđe govedo	38,57	44,29	17,14	0,607	0,393	0,443	0,480	0,072
Buša	20,59	29,41	50,00	0,353	0,647	0,294	0,464	0,356
Slavonsko-srijemski podolac	9,09	13,64	77,27	0,159	0,841	0,136	0,274	0,490
Istarsko govedo	18,52	66,67	14,81	0,518	0,482	0,667	0,509	-0,335

Kwai-Hang i sur., 1986; Aleandri i sur., 1990; Lukač-Havranek i sur. 1993; Tsiaras i sur., 2005; Balcan i sur., 2007; Karimi i sur., 2009), kazeina (Ng Kwai-Hang i sur., 1986; Braunschweig i sur., 2000) i ukupnim udjelom bjelančevina (Balcan i sur., 2007). Obzirom na udio polimornih alelnih varijanti κ -CN u populacijama simentalca, holštajna i smeđeg goveda dominira alelna A varijanta κ -CN, dok u populacijama buše i slavonsko-srijemskog podolca dominira alelna B varijanta κ -CN (tablica 3). U populaciji istarskog goveda ujednačena je raspodjela obaju alelnih varijanti κ -CN, premda je zamjetan višak heterozigotnih jedinki ($F_{IS} = -0,335$). U populacijama buše i slavonsko-srijemskog podolca zamjetan je značajan deficit heterozigotnih jedinki ($F_{IS} = 0,356$; 0,490).

U odnosu na ranije istraživanje zastupljenosti alelnih varijanti κ -CN u populaciji simentalca u Hrvatskoj (Lukač-Havranek i sur., 1992), porastao je udio alelna A varijante κ -CN (grafikon 2), što je obzirom na preradbene odlike mlijeka nepovoljno. Ranija istraživanja ukazuju da mlijeko alelna A varijante κ -CN iziskuje duže vrijeme sirenja (Lunden i sur., 1997; Kubarsepp i sur., 2005) i daje manji prinos sira s manjim udjelom bjelančevina (Ikonen i sur., 1999b; Braunschweig i sur., 2000; Miciikie-ne i sur., 2005; Molina i sur., 2006b). Zapažena je značajna dominacija alelna A varijante κ -CN u populacijama simentalca i holštajna, dok je u populaciji smeđeg goveda alelna B varijanta κ -CN zastupljenija (grafikon 2). U populaciji slavonsko-srijemskog po-

Grafikon 2. Udio alelnih varijanti κ -CN u pasminama goveda (različiti literaturni izvori)

dolca izražen je višak homozigota BB genotipa κ -CN, kao odraz kritične ugroženosti, utjecaja “osnivača linija” i “genetskog uskog grla”, što je potvrđeno i u ranijim filogenetskim istraživanjima (Ramljak i sur., 2011). Populacije buše i istarskog goveda gospodarski će zasigurno reafirmaciju doživjeti i kroz proizvodnju mlijeka i mliječnih proizvoda, čemu pogoduje značajna dominacija B varijante κ -CN.

Premda je broj analiziranih genetskih biljega mali kao i broj alela koji su uočeni po promatranim genetskim biljezima, vrijedno je promotriti osnove genetske pokazatelje po pasminama i istraživanim polimorfim bjelančevinama. Vrijednost F_{IS} koeficijenta β -Lg (-0,107) i κ -CN (0,083) u ukupno istraženom uzorku ukazuje na određenu genetsku neravnotežu pasmina, komercijalnih i izvornih. Vrijednost F_{IT} koeficijenta β -Lg (0,043) i κ -CN (0,234) ukazuje na određenu neravnotežu, odnosno izloženost selekcijskom pritisku, što je razvidno i po pojedinačnim pasminama (tablica 2, tablica 3). Vrijednost F_{ST} koeficijenta za β -Lg (0,135) i κ -CN (0,165) ukazuje na značajnu različitost istraženih populacija, što je poznajući njihovu filogenezu i uzgojnu strategiju bilo i očekivano. Različitost frekvencija alelnih polimorfih oblika β -Lg i κ -CN istraženih pasmina iskazanih kroz genetsku distancu ukazuje na značajnu distanciranost komercijalnih visoko selekcioniranih pasmina (simentalac, holštajn, smeđe govedo) naspram izvornih pasmina goveda u Hrvatskoj (slika 2).

Genetska udaljenost simentalca i smeđeg goveda je najmanja (0,001), dok je njihova genetska udaljenost naspram holštajna izraženija (0,005; 0,019). Slavonsko-srijemski podolac ima značajnu genetsku distancu naspram smeđeg goveda, simentalca, holštajna, (0,308; 0,342; 0,456) kao i preostalih izvornih pa-

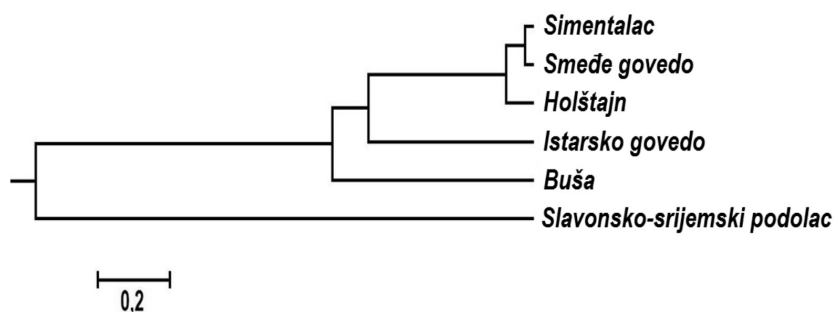
smina goveda, buše i istarskog goveda (0,171; 0,099). Istarsko govedo ima manju genetsku udaljenost naspram komercijalnih visoko selekcioniranih pasmina, što je dijelom posljedica povremenih introdukcija smeđeg goveda u populaciju istarskog goveda tijekom XX. stoljeća.

Zaključak

Provedeno istraživanje ukazuje na značajne različitosti u udjelu dominantnih polimorfih alelnih oblika β -Lg i κ -CN u populacijama goveda u Hrvatskoj. U izvornim pasminama goveda značajno su zastupljenije alelne B varijante β -Lg i κ -CN u odnosu na komercijalne pasmine, što je povoljan čimbenik za njihovu gospodarsku reafirmaciju kroz programe proizvodnje mliječnih proizvoda. Udio alelne B varijante β -Lg je dominantna u komercijalnim pasminama goveda, što treba podržavati kroz uzgojne programe. Istraživanje daje polaznu osnovu za daljnju osmišljenu gojibenu izgradnju pasmina, u suglasju s potrebama uzgajivača i prerađivačke mliječne industrije.

Zahvala

Provedba istraživanja potpomognuta je sredstvima Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske u okviru provedbe znanstveno istraživačkog projekta “Tipizacija i inventarizacija genetskih obilježja goveda u Hrvatskoj” (178-0790466-0398). Zahvaljujemo se djelatniku HPA, kolegi dr. sc. Zdenku Ivkiću i uzgajivačima istraživanjem obuhvaćenih pasmina goveda na pomoći pri prikupljanju uzoraka.



Slika 2. Neighbor-joining dendrogram temeljen na različitosti frekvencija alelnih polimorfih oblika β -Lg i κ -CN pasmina goveda u Hrvatskoj

Genetic polymorphism of β -lactoglobulin and κ -casein of cattle breeds in Croatia

Summary

Profitable milk production respects the interests of producers, processing industries, consumer requirements and welfare of animals. Development of new methods of direct gene analysis responsible for milk proteins polymorphism provide new tools to raise the profitability of milk production and dairy products through implementation of breed genetic profile in breeding program. Because of necessity to determinate genetic profiles of cattle breeds in Croatia using new analytical methods, the ratio of dominant allelic polymorphic variants of beta-lactoglobulin (β -Lg) and kappa-casein (κ -CN) is defined. The share of beta-lactoglobulin B variant is dominant in all investigated cattle breeds (>52.9 %). Kappa-casein allelic variant A is dominant in selected cattle breeds (60.7-76.4 %), while the share of B variant is significantly more presented in autochthonous cattle breeds (48.2-84.1 %). Knowledge about genetic profile of breeds due to studied polymorphic variants of milk proteins is useful in further breeding development and economic reaffirmation of cattle breeds, especially autochthonous ones.

Key words: cattle, milk protein, polymorphism

Literatura

- Ahmadi, M., Mohammadi, Y., Darmani Kuhi, H., Osfoori, R., Qanbari, S. (2008): Association of Milk Protein Genotypes with Production Traits and Somatic Cell Count of Holstein Cows. *Journal of Biological Sciences* 8, 1231-1235.
- Aleandri, R., Buttazzoni, L.G., Schneider, J.C. (1990): The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science* 73, 241-255.
- Antunac, N., Lukač-Havranek, J., Čurik, I., Samaržija, D. (1991): Polimorfizam proteina mlijeka u odnosu na proizvodnju i sastav mlijeka. *Mljekarstvo* 41, 297-302.
- Balcan, R.A., Georgescu, S.E., Adina, M., Anca, D., Tesio, C.D., Marieta, C. (2007): Identification of beta-lactoglobulin and kappa-casein genotypes in cattle. *Zootehnie si Biotehnologii* 40, 211-216.
- Braunschweig, M., Hagger, C., Stranzinger, G., Puhan, Z. (2000): Association between casein haplotypes and milk production traits of Swiss brown cattle. *Journal of Dairy Science* 83, 1387-1395.
- Caput, P., Posavi, M., Kapš, M., Lukač-Havranek, J., Ernoić, M., Gašpert, Z. (1992): Genetski polimorfizam proteina krvi i mlijeka nekih pasmina govoda. *Stočarstvo* 46, 326-336.
- Caroli, A., Chessa, S., Bolla, P., Budelli, E., Gandini, G.C. (2004): Genetic structure of milk protein polymorphism and effects on milk production traits in a local dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121, 119-127.
- Caroli, A.M., Chessa, S., Erhardt, G.J. (2009): Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science* 92, 5335-5352.
- Celik, S. (2003): β -lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. *International Dairy Journal* 13, 727-731.
- Comin, A., Cassandro, M., Chessa, S., Ojala, M., Dal Zotto, R., De Marchi, M., Carnier, P., Gallo, L., Pagnacco, G., Bittante, G. (2008): Effects of Composite β - and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 91, 4022-4027.
- Curik, I., Havranek, J., Samaržija, D. (1997): Milk protein polymorphism and genetic structure of Croatian simmental cattle. IDF Seminar "Milk Protein Polymorphism" February, 1997. Palmerston North, Novi Zeland, *IDF (special issue)* 93-99.
- Czerniawska-Piątkowska, E., Kamieniecki, H., Pilarczyk, R., Rzewuska, E. (2004): A comparison of protein polymorphisms in milk produced by two dairy farms in West Pomerania. *Archiv für Tierzucht* 47, 155-63.
- Dogru, U., Ozdemir, M. (2009): Genotyping of kappa-casein locus by PCR-RFLP in Brown Swiss cattle breed. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 779-781.
- Doosti, A., Arshi, A., Yaraghi, M., Dayani-Nia, M. (2011): Comparative study of β -lactoglobulin gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle. *Journal of Cell and Animal Biology* 5, 27-32.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M., Harwalker, V.R., Jenness, R., Whitney, R.M. (1984): Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67, 1599-1631.
- Erhardt, G. (1989): κ -caseins in bovine milk. Evidence of a further allele (κ -CN E) in different breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 106, 225-231.
- Gurcan, E.K. (2011): Association between milk protein polymorphism and milk production traits in Black and White dairy cattle in Turkey. *African Journal of Biotechnology* 10, 1044-1048.
- Heidari, M., Azari, M.A., Hasani, S., Khanahmadi, A., Zerehdaran, S. (2009): Association of genetic variants of β -lactoglobulin gene with milk production in a herd and a superior family of Holstein cattle. *Iranian Journal of Biotechnology* 7, 254-257.
- Ikonen, T., Ojala, M., Ruottinen, O. (1999a): Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *Journal of Dairy Science* 82, 1026-1033.

20. Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., Ruottinen, O. (1999b): Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82, 205-214.
21. Karimi, K., Beigi Nassiri, M.T., Mirzadeh, Kh., Ashayerizadeh, A., Roushanfekr, H., Fayyazi, J. (2009): Polymorphism of the β -lactoglobulin gene and its association with milk production traits in Iranian Najdi cattle. *Journal of Biotechnology* 7, 82-85.
22. Konovalova, E.N., Seltcov, V.I., Zinoveva, N.A. (2004): Polymorphism gene kappa casein and its effects on production traits cows Simmental breeds. *Zbornik radova 4th Conference Problems Biotechnologyin Farm Animal*, 24-25.11.2004. Dobrovitsy, Russia, pp 49-54.
23. Kübarsepp, I., Henno, M., Viinalass, H., Sabre, D. (2005): Effect of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties. *Agricultural Research* 3, 55-64.
24. Kučerová, J., Matějček, A., Jandurová, O.M., Sorensen, P., Němcová, E., Štípková, M., Kott, T., Bouška, J., Frelich, J. (2006): Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science* 51, 241-247.
25. Lin, C.Y., McAllister, A.J., Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Batra, T.R. (1989): Relationships of milk protein types to lifetime performance. *Journal of Dairy Science* 72, 3085-3090.
26. Lukač-Havranek, J., Čurik, I., Samaržija, D., Antunac, N., Posavi, M. (1992): Polimorfizam proteina mlijeka u goveda. *Stočarstvo* 46, 277-306.
27. Lukač-Havranek, J., Čurik, I., Kapš, M., Antunac, N., Samaržija, D. (1993): Povezanost polimorfizma β -laktoglobulina s mliječnim proizvodnim osobinama hrvatskog simentalca II. Utjecaj gena. *Stočarstvo* 47, 419-423.
28. Lunden, A., Nilsson, M., Janson, L. (1997): Marked effect of beta-lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science* 80, 2996-3005.
29. Mayr, B., Stigihuber, A., Schieger, W. (1992): Häufigkeit des A- und B-Allels für k-Casein bei österreichischen Teststieren der Fesse Fleckvieh, dargestellt mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Technik. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 79, 65-68.
30. Medrano, J.F., Aguilar-Cordova, E. (1990): Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Bio-Technology* 8, 144-146.
31. Miceikiene, I., Peculaitiene, I., Petraskiene, N. (2005): Milk genotypes and their association with milk composition traits in the Lithuanian dairy cattle. *Medycyna Weterynaryjna* 61, 394-397.
32. Molina, L.H., Kramm, J., Brito, C., Carrillo, B., Pinto, M., Ferrando, A. (2006a): Protein composition of milk from Holstein-Friesian dairy cows and its relationship with the genetic variants A and B of κ -casein and β -lactoglobulin (Part I.). *International Journal of Dairy Technology* 59, 183-187.
33. Molina, L.H., Benavides, T., Brito, C., Carrillo, B., Molina, I. (2006b): Relationship between A and B variants of κ -casein and β -lactoglobulin and coagulation properties of milk (Part II.). *International Journal of Dairy Technology* 59, 188-191.
34. Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E., Monardes, H.G. (1986): Association Between Milk Proteins Polymorphisms and Major Milk Constituents in Holstein-Friesian Cows. *Journal of Dairy Science* 69, 22-26.
35. Ng-Kwai-Hang, K.F., Monardes, H.G., Hayes, J.F. (1990): Association Between Genetic Polymorphism of Milk Proteins and Production Traits During Three Lactations. *Journal of Dairy Science* 73, 3414-3420.
36. Ng-Kwai-Hang, K.F., Dodds, C., Boland, M.J., Auld, M.J. (2002): The influence of genetic variant of β -lactoglobulin on speed and firmness of rennet curd. *Milchwissenschaft* 57, 267-269.
37. Rahali, V., Ménard, J.L. (1991): Influence of genetic variants of β -lactoglobulin and κ -casein on milk composition and cheesemaking properties. *Lait* 71, 275-297.
38. Ramljak, J., Ivanković, A., Veit-Kensch, C., Förster, M., Međugorac, I. (2011): Analysis of genetic and cultural conservation value of three indigenous Croatian cattle breeds in a local and global context. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 128, 73-84.
39. Raymond, M., Rousset, F. (1995): GENEPOP, Version 1.2, Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
40. Ren, D.X., Miao, S.Y., Chen, Y.L., Zou, C.X., Liang, X.W., Liu, J.X. (2011): Genotyping of the κ -casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. *Journal of Genetics* 90, 1-5.
41. Sabour, M.P., Lin, C.Y., Keough, A., Mechanda, S.M., Lee, A.J. (1993): Effects of selection practiced on the frequencies of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in Canadian artificial insemination bulls. *Journal of Dairy Science* 76, 274-280.
42. Sitkowska, B., Wojciech, N., Ewa, W. (2008): Relations between kappa-casein polymorphism (CSN3) and milk performance traits in heifer cows. *Journal of Central European Agriculture* 9, 641-644.
43. Snoj, A., Međugorac, I., Rogelj, I., Dovč, P., Graml, R. (1991): Utjecaj genetskih varijanti kapa kazeina na koagulacijska svojstva mlijeka. *Mljekarstvo* 41, 303-307.
44. Strazalkowska, N., Kzewishski, J., Ryniewicz, Z. (2002): Effect of Kappa-casein and beta-lactoglobulin polymorphism on cows age, stage of lactation and somatic cell count on dairy milk composition in Polish Black and White cattle. *Animal Science Papers and Reports* 20, 21-35.
45. Sulimova, G.E., Azari, M.A., Rostamzadeh, J., Abadi, M.M.R., Lazebny, O.E. (2007): κ -casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. *Russian Journal of Genetics* 43, 73-79.
46. Tsiaras, A.M., Bargouli, G.G., Banos, G., Boscós, C.M. (2005): Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88, 327-334.
47. Van Eenennaam, A., Medrano, J.F. (1991): Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74, 1730-1742.