

GENOTIPIFICACIÓN DE KAPPA-CASEÍNA BOVINA Y EVALUACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE SUS POLIMORFISMOS EN CUATRO RAZAS

GENOTYPING OF BOVINE KAPPA-CASEIN AND EVALUATION OF GENOTYPIC AND ALLELIC FREQUENCIES OF THEIR POLYMORPHISMS IN FOUR BREEDS

Esperanza Trujillo¹, David Noriega² y Mauricio Camargo³

Resumen

En la leche de los rumiantes existen seis proteínas principales clasificadas en dos grupos: caseínas (α -S1, α -S2, β y κ) y proteínas séricas (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina). La *kappa*-caseína bovina es una molécula de 169 aminoácidos codificada por un gen localizado en el cromosoma 6 y tiene dos importantes variantes: A y B. La variante B determina diferencias cuantitativas y cualitativas en el proceso de transformación de la leche en queso debido a que forma micelas pequeñas que contienen mayor cantidad de caseína y origina un coágulo firme y denso que retiene sólidos. En contraste, la variante A produce micelas más grandes pero con menor cantidad de caseína.

En el presente estudio se realizó, mediante PCR-RFLP, la identificación molecular de las variantes alélicas A y B en una población de 222 animales (machos y hembras) de las razas Holstein, Ayrshire, Jersey y Normanda. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas mediante la prueba exacta de Freeman-Halton, tanto en la distribución de frecuencias genotípicas como alélicas en la raza Holstein (Holstein: AA = 0.48, AB = 0.48, BB = 0.04 y $p(B)$ = 0.28; Ayrshire: AA = 0.43, AB = 0.37, BB = 0.20 y $p(B)$ = 0.38; Jersey: AA = 0.03, AB = 0.17, BB = 0.80 y $p(B)$ = 0.88; Normanda: AA = 0.00, AB = 0.33, BB = 0.67 y $p(B)$ = 0.83).

Este estudio constituye el primero de su tipo en Colombia y propone la aplicación de una metodología molecular confiable, de fácil aplicación y bajo costo en los programas de mejoramiento de la calidad de la proteína láctea en bovinos.

Palabras clave: *kappa*-caseína bovina, proteína láctea, PCR-RFLP.

Abstract

The milk of ruminants contains six main types of proteins classified in two groups: caseins (α -S1, α -S2, β and κ) and serum proteins (α -lactoalbumin and β -lactoglobulin). The bovine *kappa*-casein is a molecule of 169 amino acids coded by a gene on chromosome 6, that express two important variations, A and B. The B form determines quantitative and qualitative differences in the process of transformation of the milk in cheese, due to the formation of small micelles that contain a higher amount of casein that in turn allow the formation of a firm and dense clot that retains solids. In contrast, the A form produces larger micelles that retain a smaller amount of casein.

Using the PCR-RFLP methodology, the present study was carried out to identify the allelic forms A and B at the DNA level, in a population of 222 animals males and females of the races Holstein, Ayrshire, Jersey and Norman. The results obtained evidenced significant differences by means of Freeman-Halton exact test in the distribution of genotypic and allelic frequencies in the breed Holstein (Holstein: AA = 0.48, AB = 0.48, BB = 0.04 and $p(B)$ = 0.28; Ayrshire: AA = 0.43, AB = 0.37, BB = 0.20 and $p(B)$ = 0.38; Jersey: AA = 0.03, AB = 0.17, BB = 0.80 and $p(B)$ = 0.88; Normand: AA = 0.00, AB = 0.33, BB = 0.67 and $p(B)$ = 0.83).

Recibido: enero de 2000; aprobado para publicación: abril de 2000.

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: etbravo@epm.net.co.

² Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: danove13@hotmail.com.

³ Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: mcamargo@epm.net.co.

This study constitutes the first one of this type in Colombia, and proposes the application of a reliable molecular methodology, of easy application and low cost in programs of improvement of bovine milk protein quality.

Key words: bovine *kappa*-casein, milk protein, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

La mejora genética de las características de naturaleza cuantitativa, como la producción y calidad de la leche bovina, se ha hecho tradicionalmente utilizando principios estadísticos para identificar animales que se seleccionan dentro de poblaciones, acompañada de cruzamientos entre los mismos para aprovechar el efecto del vigor híbrido. Esta metodología ha resultado difícil y lenta cuando se trabaja con características de baja heredabilidad y que se expresan en un solo sexo (Misztal y Wiggans, 1988).

Por otro lado, el desarrollo de mapas genéticos en diferentes especies ha hecho posible identificar regiones cromosómicas con genes que afectan las características cuantitativas, ya sea utilizando los genes responsables de las mismas o mediante marcadores moleculares que segregan ligados directamente con características de producción (Davies y Tilghman, 1992), con lo que se mejora la eficiencia de selección en cuanto a rendimiento y calidad de los productos (Archibald, 1994).

El genoma bovino contiene aproximadamente tres mil millones de pares de bases, empacadas en 30 cromosomas, de las cuales se calcula que sólo el 10% contiene información útil traducible en proteínas (Barendse, 1994). Entre estas secuencias ocurren mutaciones que generan diferentes polimorfismos heredables, que pueden alterar o no las proteínas que codifican y afectar en forma positiva o negativa las funciones de los organismos. Una forma de tipificar estos polimorfismos es mediante la amplificación molecular de una región del gen, seguida de la digestión con una enzima de restricción apropiada, metodología conocida como PCR-RFLP (Clark, 1992).

Proteínas lácteas

En mamíferos, una de las principales características de la leche es su alto contenido en proteínas que determinan en gran medida el valor nutritivo y tecnológico de la misma. En Colombia, el 70% de la leche se produce en forma intensiva con base racial Holstein, 20% con Holstein y Cebú, 8% con Jersey y 2% con razas criollas.

En la leche de los rumiantes existen seis proteínas principales que constituyen el 90% del total de las proteínas de la leche, clasificadas en dos grupos de acuerdo con su solubilidad a pH 4.6 y a una temperatura de 20 °C (Kanamori y Kawaguchi, 1980). El primer grupo lo constituyen las caseínas α S1, α S2, β y κ (Eigel y Butler, 1984), que precipitan en estas condiciones de pH y temperatura y constituyen la fracción proteica mayoritaria de la leche. Las del segundo grupo, o proteínas séricas, permanecen solubles en las condiciones mencionadas, y son principalmente α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina (Eigel y Butler, 1984).

Las caseínas se agregan en partículas coloidales esféricas llamadas micelas, antes de ser secretadas por exocitosis; en peso seco, las micelas contienen aproximadamente 94% de proteína y 6% de iones calcio, fosfato, magnesio y citrato, y sus características influyen notablemente en las propiedades tecnológicas de la leche (Grosclaude, 1988). La desestabilización de las micelas inicia el proceso de coagulación y gelificación de la leche durante la fabricación del queso (Russo y Mariani, 1978; Schaar, 1984).

El gen de la *kappa*-caseína bovina tiene 9.844 pares de bases, comprende cinco exones y cua-

tro intrones y está localizado en el cromosoma 6 (Velmalá *et al.*, 1999). Su proteína es responsable de la estabilidad de las micelas y su hidrólisis modifica sus características físicoquímicas (Grosclaude, 1988).

La base molecular del polimorfismo de las proteínas de la leche es la sustitución o la delección de aminoácidos en su estructura primaria, generada por cambios en la secuencia de los genes que codifican para las mismas. La *kappa*-caseína es una proteína de 169 aminoácidos que presenta dos importantes variantes, *kappa*-caseína A y *kappa*-caseína B (Neelin, 1964; Schmidt, 1964), determinadas por los alelos A y B, respectivamente (Grosclaude, 1988; Ikonen *et al.*, 1996). Estas variantes difieren en los aminoácidos 136 y 148. En la posición 136, la variante A tiene treonina (T) y la B isoleucina (I); y en la posición 148, A tiene asparagina (N) y B tiene alanina (A) (Bovenhuis y Weller, 1994). El cambio en la posición 148 elimina el sitio de corte de la enzima de restricción Hinf I (figura 1) en la secuencia de nucleótidos que determinan la variante B, y que se encuentra presente en la secuencia que codifica para la variante A (Gorodetsky y Kaledin, 1987; Kang y Richardson, 1988), lo cual permite distinguirlas en las diferentes pruebas moleculares.

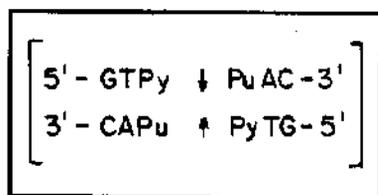


Figura 1. Secuencia de corte de la enzima de restricción Hinf I

Por otra parte, la proteína B determina diferencias cuantitativas y cualitativas en el proceso de la transformación de leche en queso debido a que forma micelas pequeñas que contienen mayor cantidad de caseína, lo que a su vez produce un coágulo firme y denso que retiene sólidos (Russo y Mariani, 1978; Marzialli, 1986) e incrementa en

3% la cantidad total de proteína (Gibson y Rozzi, 1990). De esta manera se mejora la calidad del queso y se disminuyen los costos de producción comparados con la variante A, que produce micelas más grandes y menor cantidad de caseína (Morini *et al.*, 1975).

El alelo B de la *kappa*-caseína eleva la concentración de la *kappa*-caseína en la leche de los bovinos (Van Eenennaam y Medrano, 1991a), lo que es consistente con el efecto de los genotipos ($BB > AB > AA$) sobre la proporción de esta proteína en la fracción total de caseína en la leche (Ng-Kwai-Hang, 1987).

El modelo más aceptado en cuanto a la conformación de las micelas de caseína propone un núcleo compuesto por las proteínas $\alpha S1$, $\alpha S2$ y β , asociadas una con otra en el interior de la micela e interactuando con el calcio y la *kappa*-caseína que predomina sobre la superficie de la micela, lo cual proporciona estabilidad a la estructura micelar (Schmidt, 1982).

La presencia de *kappa*-caseína B reduce el tamaño de la micela, lo cual aumenta su estabilidad térmica y reduce el peligro de coagulación y gelificación durante los procesos de esterilización (Fox, 1982; Medrano y Aguilar-Córdova, 1990; Di Gregorio y Rando, 1991). En la fabricación del queso, esta proteína B es cortada en dos segmentos por la quimosina (localizada en el rumen del ternero) o por el cuajo. Los segmentos generados son un macropéptido que va a la fracción soluble de las proteínas lácteas, y la *para-kappa*-caseína, que conforma una malla que retiene sólidos (Marzialli, 1986; Ikonen *et al.*, 1999) y forma una cuajada más firme y densa (Ojala *et al.*, 1997).

Estas dos variantes A y B de *kappa*-caseína están presentes en todas las razas bovinas estudiadas, pero el alelo A tiende a predominar en la mayor parte de ellas, con excepción de las razas Jersey y Normanda (Schlee y Rottmann, 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra poblacional

En el presente estudio se realizó, mediante PCR-RFLP, la evaluación molecular de las variantes alélicas A y B en una población de 222 animales (machos y hembras) de las razas Holstein, Ayrshire, Jersey y Normanda (tabla 1).

Tabla 1. Muestra poblacional. Descripción del número de individuos genotipados para *kappa*-caseína en cada una de las cuatro razas estudiadas

Razas	No de animales
Holstein	117
Ayrshire	30
Jersey	60
Normanda	15
Total	222

Extracción del DNA

Se tomó una muestra de 7 ml de sangre a cada animal, recolectada en tubos secos con EDTA, y se refrigeró hasta su procesamiento. El DNA se extrajo utilizando el método de "salting out" y su precipitación se hizo con isopropanol. El DNA obtenido fue resuspendido en 200 µl del buffer TE (10mM tris, 1mM EDTA) y guardado en tubos eppendorf de 0.5 ml a -4 °C.

Amplificación de DNA por PCR

Se amplificó el DNA genómico en un volumen total de 25 µl de mezcla de reacción. La mezcla

de PCR contenía buffer 10X, MgCl₂ 25mM, Taq Polimerasa 2.5u, dNTPs 10mM c/u, primers JK3 y JK5 25pM c/u (CorpoGen), y 0.7 µg/ml de DNA. El volumen final se completó con agua tri-distilada estéril.

Las muestras fueron amplificadas con un primer ciclo a las siguientes temperaturas: desnaturalización 97 °C, 2 min; alineación de primers 60 °C, 1 min; extensión 72 °C, 1 min. El proceso se continuó con 35 ciclos (94 °C, 1 min, 60 °C, 1 min, 72 °C, 1 min), finalizando con un ciclo de extensión a 72 °C por 7 min.

Los primers utilizados fueron JK-3 5' AGACA-ATGTCTCTTCCGCTTTACCCG 3' y JK5 5' ATCAITTTATGGCCATTCACCAAAG 3', que amplificaron un fragmento de 350 pb, de las cuales 201 corresponden al exón IV y 149 al intrón IV; el producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y se comparó con un marcador de peso molecular (figura 2).

Reacción de restricción

El fragmento amplificado fue sometido a digestión con la enzima de restricción Hinf I durante 4 h a 37 °C. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl. La mezcla de reacción contenía 5 u de Hinf I (Promega), 5 µl de PCR-DNA, buffer NEB2 (Promega) y buffer BSA, y se completó el volumen con agua tridestilada estéril. Los productos de la digestión tuvieron tamaños de 134, 132 y 84 pb para el alelo A, y 266 y 84 pb para el alelo B.

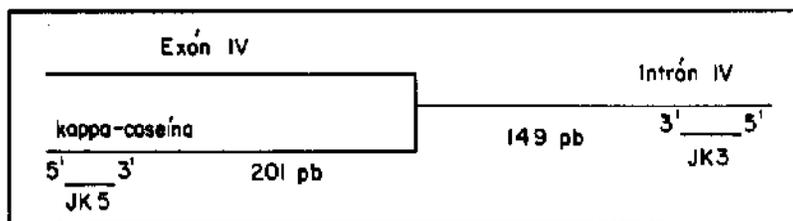


Figura 2. Ubicación de los primers en el gen. Fragmento amplificado de 350 pb del gen de *kappa*-caseína correspondientes a 201 pb del exón IV y 149 pb del intrón IV (tomado de Medrano y Aguilar-Córdova, 1990)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el genotipo *AA* se diferenciaron dos bandas: una de 84 pb y otra intensa que corresponde a los fragmentos de 134 y 132 pb, ya que éstos no alcanzan a resolverse en agarosa. Para el genotipo *BB* se observaron dos bandas que corresponden a los fragmentos de 266 y 84 pb, respectivamente. Para el genotipo heterocigótico se observaron tres bandas que comprenden 266 pb, 134/132 pb y 84 pb (figura 3).

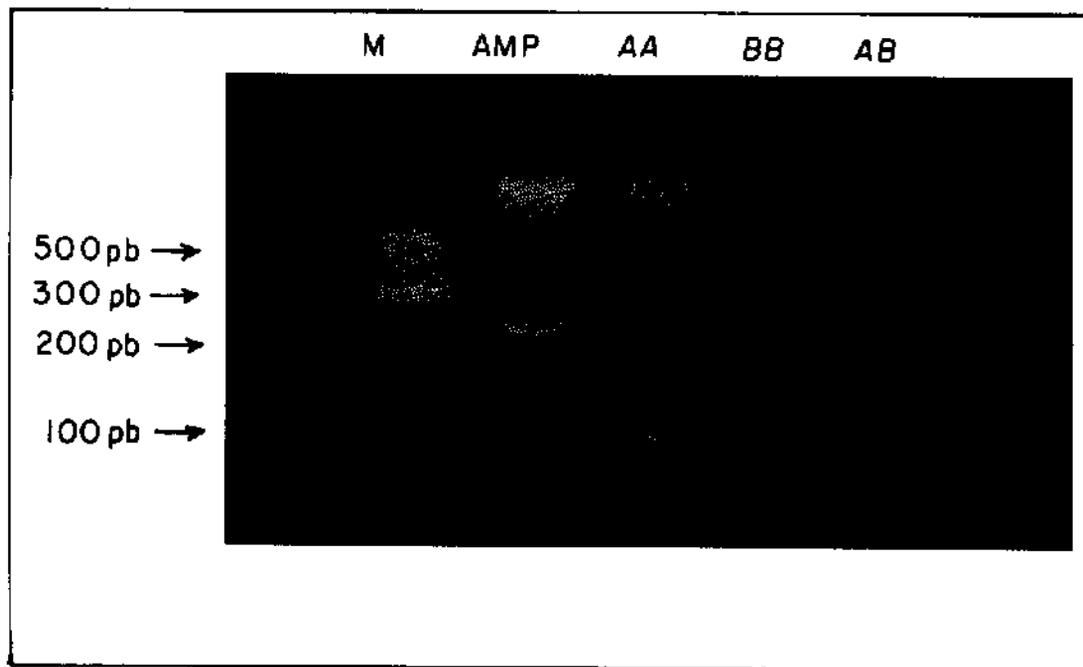


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el patrón de bandas de los genotipos *AA*, *AB* y *BB* de kappa-caseína bovina (M = marcador; Amp = amplificado, sin cortar con Hinf I)

La baja frecuencia del genotipo *BB* en animales Holstein indica que en esta raza se ha incrementado el número de animales genotípicamente *AA*, posiblemente como consecuencia de endogamia, deriva o selección de otra característica relacionada. Esto implica que la población de la raza Holstein analizada presentaría el menor contenido de caseínas en la leche, cuando se compara con las otras tres razas estudiadas. En la raza Ayrshire se observa un resultado similar al anterior en cuanto al genotipo desfavorable *AA* (figura 5), y por consiguiente también se espera un contenido menor de caseínas en su leche.

Las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en nuestro trabajo para los cuatro grupos raciales estudiados fueron: Holstein: *AA* = 0.48, *AB* = 0.48 y *BB* = 0.04, $p(A) = 0.72$, $p(B) = 0.28$; Ayrshire: *AA* = 0.43, *AB* = 0.37 y *BB* = 0.20, $p(A) = 0.62$, $p(B) = 0.38$; Jersey: *AA* = 0.03, *AB* = 0.17 y *BB* = 0.80, $p(A) = 0.12$, $p(B) = 0.88$; Normanda: *AA* = 0.00, *AB* = 0.33, *BB* = 0.67, $p(A) = 0.17$, $p(B) = 0.83$ (figuras 4, 5, 6 y 7). El alelo favorable *B* es más frecuente en las razas Jersey y Normanda y está casi ausente en Holstein y Ayrshire.

Las frecuencias obtenidas para la raza Holstein muestran diferencias significativas mediante la prueba de Freeman-Halton con un nivel de significancia del 95% cuando se comparan con resultados obtenidos para la misma raza en Estados Unidos (tabla 2).

En las muestras analizadas de las razas Jersey y Normanda se observaron frecuencias genotípicas *BB* de 0.80 y 0.67, respectivamente, que implican mayor contenido de caseína en la leche y, por consiguiente, mayor concentración de sólidos totales, lo cual permite aumentar la produc-

Tabla 2. Frecuencias genotípicas de *kappa*-caseína reportadas en la literatura de estudios realizados en California (USA) (Van Eenennaam y Medrano, 1991b) y los obtenidos en este estudio en Antioquia (Colombia)

Razas	AA		AB		BB	
	USA	Antioquia	USA	Antioquia	USA	Antioquia
Holstein	0.81	0.48	0.03	0.48	0.16	0.04
Ayrshire	0.37	0.43	0.48	0.37	0.15	0.20
Jersey	0.00	0.00	0.19	0.20	0.81	0.80
Normanda	0.09	0.00	0.42	0.33	0.49	0.67

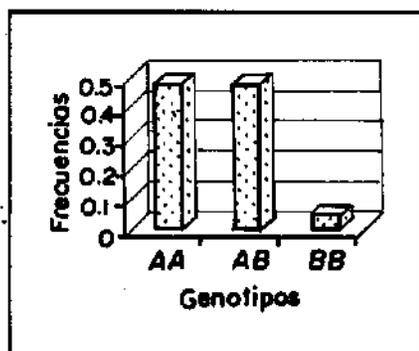


Figura 4. Representación gráfica de las frecuencias genotípicas AA, AB y BB de *kappa*-caseína en la muestra poblacional Holstein

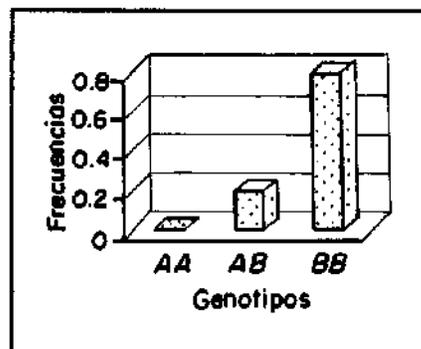


Figura 6. Representación gráfica de las frecuencias genotípicas AA, AB y BB de *kappa*-caseína en la muestra poblacional Normanda

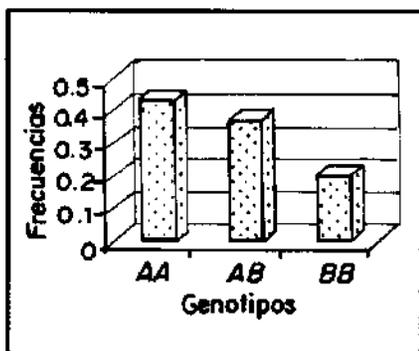


Figura 5. Representación gráfica de las frecuencias genotípicas AA, AB y BB de *kappa*-caseína en la muestra poblacional Ayrshire

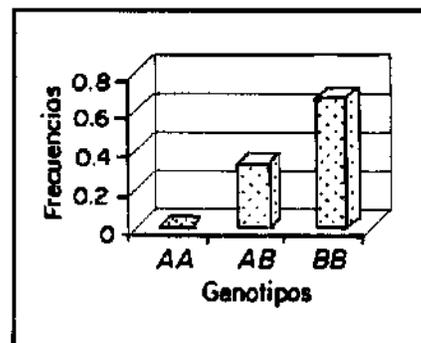


Figura 7. Representación gráfica de las frecuencias genotípicas AA, AB y BB de *kappa*-caseína en la muestra poblacional Jersey

ción de quesos con mejor calidad y con menores costos de fabricación. Además, los resultados muestran una diferencia no significativa en la frecuencia del genotipo BB comparada con los resultados reportados para poblaciones norteamericanas (Van Eenennaam y Medrano, 1991).

Por otro lado, utilizando la prueba estadística de Freeman-Halton para comparar entre sí el valor de las frecuencias genotípicas (AA, AB y BB) en

cada una de las diferentes razas estudiadas, se encontró que para las razas Holstein y Jersey estas frecuencias presentaron diferencias significativas, lo que no ocurrió en las razas Ayrshire y Normanda (tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de *kappa*-caseína bovina

Razas	AA	AB	BB	P*
Holstein	0.48	0.48	0.04	< 0.001
Ayrshire	0.43	0.37	0.20	0.07
Jersey	0.03	0.17	0.80	< 0.001
Normanda	0.00	0.33	0.67	0.006

* Resultados de la prueba exacta de Freeman-Halton

CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró que las frecuencias genotípicas para *kappa*-caseína en las razas Ayrshire, Jersey y Normanda de las poblaciones bovinas estudiadas en algunos hatos lecheros en Antioquia son similares a las reportadas en estudios realizados en Estados Unidos, mientras que para la raza Holstein los valores de las frecuencias genotípicas presentan diferencias significativas.

Las poblaciones analizadas de los ganados Holstein y Ayrshire presentaron un incremento en la frecuencia esperada del genotipo AB, posiblemente

como consecuencia de cruces previamente seleccionados que tuvieron en cuenta únicamente rasgos de producción. Por otra parte, las muestras analizadas de las razas Jersey y Normanda presentaron una alta frecuencia del genotipo BB de *kappa*-caseína, lo que permite obtener en estos animales leche de mejor calidad para la elaboración de queso, ya que su contenido mayor de proteína y sólidos totales asociados con el alelo B determina una mejor gelificación y la formación de una cuajada más firme y de mayor consistencia.

El presente estudio constituye el primero de su clase realizado en Colombia, y propone la aplicación de una metodología molecular confiable, de fácil aplicación y bajo costo que permite conocer el genotipo (AA, AB o BB) del animal para incrementar, mediante cruces dirigidos, la frecuencia del alelo B en los programas de mejoramiento de la calidad de la proteína láctea en bovinos.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Universidad de Antioquia y la Cooperativa Lechera de Antioquia (Colanta). Agradecemos a los doctores Jenaro Pérez y Francisco Uribe por su entusiasta colaboración y apoyo, y al médico veterinario Víctor Londoño por su contribución en la toma de las muestras.

REFERENCIAS

- Archibald AL. 1994. Mapping of the pig genome. *Curr Opin Genet Develop* 4:395-401.
- Barendse W. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6:227-235.
- Bovenhuis H, Weller JI. 1994. Mapping and analysis of dairy cattle quantitative trait loci by maximum likelihood methodology using milk protein genes as genetic markers. *Genetics* 137:267-280.
- Clark AJ. 1992. Prospects for the genetic engineering of milk. *J Cell Biochem* 49:121-127.
- Davies KE, Tilghman SM. 1992. *Genome analysis*. Vol 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Di Gregorio P, Rando A. 1991. DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *Anim Genet* 22:21-30.
- Eigel WN, Butler JE. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *J Dairy Sci* 67:1599-1631.
- Fox PF. 1982. Heat induced coagulation of milk. *En: Develop Dairy Chem*. Vol 1, *Appl Sci* New York, 189 p.
- Gibson JP, Rozzi P. 1990. The use of K-casein genotypes in Dairy Cattle breeding. *Proc 4th World Congr Genet Appl Livest Prod*. Edinburgh, Scotland XIV:163.
- Gorodetsky SI, Kaledin AS. 1987. Nucleotide sequence analysis of cow K-casein cDNA. *Genetika* 23:596-604.
- Grosclaude F. 1988. Le polymorphisme génétique des principaux lactoprotéines bovines. *NRA Prod Anim* 1:5-17.
- Ikonen T, Ruottinen O, Erhardt G, Ojala M. 1996. Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new *kappa*-casein variant. *Anim Genet* 27:179-181.

- Ikonen T, Ahlfors K, Kempe R, Ojala M, Ruottinen O.** 1999. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *J Dairy Sci* 82:205-214.
- Kang Y, Richardson J.** 1988. Molecular cloning and expression of bovine K-casein in *E. coli*. *J Dairy Sci* 71:29-40.
- Kanamori M, Kawaguchi F.** 1980. Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine K-casein from normal milk. *Agric Biol Chem* 44:1855.
- Marziali AS.** 1986. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *J Dairy Sci* 69:1793-1798.
- Medrano JF, Aguilar-Córdova E.** 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology* 8:144-146.
- Misztal I, Wiggans GR.** 1988. Approximation of prediction error, variance in large scale animal models. *J Dairy Sci* 71(suppl 2):27.
- Morini D, Losi GB, Castagnetti M.** 1975. L'influenza delle varianti genetiche della K-caseina sulla dimensions delle micelle caseiniche. *Sci Lech Latt Cas* 26:437.
- Ng-Kwai-Hang, KF.** 1987. Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J Dairy Sci* 70:563.
- Neelin JM.** 1964. Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 47:506-509.
- Ojala M, Famula TR, Medrano JF.** 1997. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *J Dairy Sci* 80:1776-1785.
- Russo V, Mariani P.** 1978. Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico tecnologico e caseario. *Rev Zootec Veterin* 5:1-31.
- Schaar J.** 1984. Effects of K-casein genetic variants and lactation number of the renneting properties of individual milks. *J Dairy Rev* 51:397.
- Schlee P, Rottmann O.** 1992. Identification of bovine K-casein C using the polymerase chain reaction. *J Anim Breed Genet* 109:153-155.
- Schmidt DG.** 1964. Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* 90:411-414.
- Schmidt DG.** 1982. Association of caseins and casein micelle structure. *Develop Dairy Chemistry* 1:61.
- Van Eenennaam A, Medrano JF.** 1991a. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous K-casein cow's. *J Dairy Sci* 74:1491-1496.
- Van Eenennaam A, Medrano JF.** 1991b. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J Dairy Sci* 74:1730-1742.
- Velmalä R, Vilkkä J, Elo K, Mäki-Tanila A.** 1999. Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. *Anim Genet* 26:419-425.