



Institutionen för husdjursgenetik

Genetisk variation av betydelse för mjölk kvalitet i Rödkullerasen

av

Petra Umeland

Handledare:

Anne Lundén

Jessica Näslund

Examensarbete 283

2006

Examensarbete ingår som en obligatorisk del i utbildningen och syftar till att under handledning ge de studerande träning i att självständigt och på ett vetenskapligt sätt lösa en uppgift. Föreliggande uppsats är således ett elevarbete och dess innehåll, resultat och slutsatser bör bedömas mot denna bakgrund. Examensarbete på D-nivå i ämnet husdjursgenetik, 20 p (30 ECTS).



Institutionen för husdjursgenetik

Genetisk variation av betydelse för mjölk kvalitet i Rödkullerasen

av

Petra Umeland

Agrovoc: Milk, quality, gene frequency, cattle, endemic breeds
Övrigt: Rödkullor, lantraser, mjölk kvalitet, genfrekvenser

Supervisors:

Anne Lundén

Jessica Näslund

**Examensarbete 283
2006**

Examensarbete ingår som en obligatorisk del i utbildningen och syftar till att under handledning ge de studerande träning i att självständigt och på ett vetenskapligt sätt lösa en uppgift. Föreliggande uppsats är således ett elevarbete och dess innehåll, resultat och slutsatser bör bedömas mot denna bakgrund. Examensarbete på D-nivå i ämnet husdjursgenetik, 20 p (30 ECTS).

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

FÖRORD	3
SAMMANFATTNING	4
INTRODUKTION	5
RÖDKULLOR	6
<i>Historik om rödkullerasen</i>	6
<i>Nordiska rödkullor</i>	6
Vestland- och Östlandsfeet.....	6
Finska rödkullor	7
<i>Avelsföreningen för rödkullor</i>	7
<i>Den moderna rödkullans kännetecken</i>	8
<i>Rödkulleavel</i>	8
<i>Bevarande av små populationer</i>	9
GENER MED STOR INVERKAN PÅ MJÖLKKVALITETSEGENSKAPER.....	10
<i>Mjölkteiner</i>	10
Kaseiner.....	11
β -laktoglobulin	11
Mjölkteinernas genetiska polymorfism.....	11
Genetiska varianter av κ -kasein, β -kasein och β -laktoglobulin	12
Allelfrekvenser	12
Effekter av κ -kasein polymorfism.....	14
Effekter av β -kasein polymorfism.....	14
Effekter av β -laktoglobulin polymorfism.....	15
Olika varianters inverkan på processegenskaperna hos mjölk.....	15
<i>"Räkgenen" FMO3</i>	16
Effekt av FMO3-mutationen	17
Allelfrekvenser	18
<i>"Fetthaltsgenen" DGAT1</i>	18
Mjölkfett.....	18
DGAT1-genen.....	19
DGAT1-polymorfism.....	19
Effekt av DGAT1-varianter	20
Allelfrekvenser	20
EGEN UNDERSÖKNING	21
MATERIAL OCH METODER.....	21
<i>Djurmaterial</i>	21
<i>DNA preparering</i>	21
DNA-preparering från blod:.....	21
DNA-preparering från sperma:	22
DNA-preparering från pellet:	22
<i>PCR</i>	22
PCR-primrar:.....	22
PCR-mix:	22
PCR-program:	22
Testgel:.....	22
Sekvensprimrar:	23
<i>Identifiering av genotyp - pyrosequencing</i>	23
χ^2 -test.....	23
RESULTAT.....	24
<i>Genotypfrekvenser</i>	24

<i>Allelfrekvenser</i>	24
DISKUSSION	25
χ^2 -test.....	25
<i>Rödkullornas mjölk kvalitet och allelfrekvenser</i>	25
κ -kasein	25
β -kasein	26
β -laktoglobulin	26
FMO3	26
DGAT1	26
<i>Spridning av κ-kasein E-allelen och FMO3 X-allelen</i>	27
<i>Tjurar med önskvärd genotyp</i>	27
<i>Framtida avel</i>	27
<i>Varför bör rödkullorna bevaras för framtiden?</i>	28
ABSTRACT	29
REFERENSER	30
BILAGOR	35

FÖRORD

Detta examensarbete har gjorts på uppdrag av Sveriges Rödkulleförening. Syftet var att, som ett led i arbetet för att bevara rasen, utröna om rödkullerasen bär på fördelaktiga varianter av gener som kontrollerar olika mjölkvalitetssegenskaper, vilket skulle bidra till att öka intresset för rasen inom mjölkproduktionen.

Sperma för genotypbestämning från totalt 65 rödkulletjurar har välvilligt tillhandahållits av Svensk Avel samt Jordbruksverket. Bidrag till kostnaden för genotypbestämning har erhållits från Jordbruksverket och Sveriges Rödkulleförening.

Ett varmt tack riktas till Gustav Larsson, ordförande i Sveriges Rödkulleförening, som hjälpt mig att hitta såväl historiskt som aktuellt material rörande rödkullor.

Segoltan 2006
Petra Umeland

SAMMANFATTNING

Rödkullorna är en utrotningshotad ras vilken anses utgöra resterna av en allmogeko som främst förekom i mellersta Sverige. Det finns cirka 1 100 renrasiga djur kvar och sperma finns lagrad hos seminföreningar och genbanker från ett 60-tal tjurar. Rasen kan komma att få en viktig roll för bevarandet av genetisk diversitet på artnivå, vilken kan komma till användning vid ändrade produktionsförhållanden, ändrad miljö eller ändrad inriktning av produktionen. Mjölakens sammansättning är exempel på en egenskap som kan bli föremål för modifiering som ett led i utvecklandet av nya mejeriprodukter. Sammansättningen påverkar såväl mjölakens processtekniska egenskaper som övriga kvalitetsegenskaper och är därför viktig ur ekonomisk synpunkt. Syftet med denna studie var att utröna om rödkullerasen bär på fördelaktiga varianter av gener som kontrollerar olika mjölkkvalitetsegenskaper, vilket skulle bidra till att öka intresset för rasen inom mjölkproduktionen. Vi undersökte tre mjölkprotein gener, β -kasein, κ -kasein och β -laktoglobulin, och ytterligare två gener med betydande effekt på mjölakens sammansättning och kvalitet, "räkgenen" *FMO3* och "fetthaltsgenen" *DGATI*, för att ta reda på vilka alleler som rödkullorna bär. De mest önskvärda mjölkprotein allelerna anses vara β -kasein A2, κ -kasein B och β -laktoglobulin B. Vad gäller *FMO3* är R-allelen den eftersträvarvärda eftersom kor som är homozygota för X-allelen producerar en mjölk med smak påminnande om gamla räkskal, men även heterozygota kor har i vissa fall fått smakfelsanmärkning. Kor homozygota för *DGATI* A-allelen producerar mer mjölk men med lägre fetthalt än kor med KK-genotyp.

Undersökningen gjordes på 65 avelstjurar av rödkulleras, födda mellan åren 1961-2003. Tjurarna i studien var i de flesta fall nära släkt med varandra. Genotypbestämningen gjordes med hjälp av PCR och pyrosequencing baserat på fryst sperma. Resultaten visar att allelerna β -kasein A2, κ -kasein A, β -laktoglobulin A, *FMO3* R och *DGATI* A är de vanligast förekommande varianterna hos de typade rödkulletjurarna. Allel frekvenserna vad gäller de tre mjölkprotein generna överensstämmer relativt väl med resultat från tidigare studier av svensk rödkulla (Lien *et al.* 1999) medan allel frekvenserna för "räkgenen" *FMO3* och "fetthaltsgenen" *DGATI* inte tidigare undersökts hos denna ras. Föreliggande studie påvisar inte heller några väsentliga skillnader mellan rödkullor och de dominerande svenska mjölkkraserna SRB och SLB i allel frekvenser i de undersökta generna.

Några av rödkulletjurarna i studien befanns vara heterozygota för "räkgenen", dvs *FMO3* X-allelen. Även bärare av κ -kasein E-allelen observerades bland rödkulletjurarna, en variant som rapporterats vara associerad med försämrade ystningsegenskaper (bl.a. Ikonen *et al.*, 2001) . Intressant i sammanhanget är att den östnorska rödkullan verkar bära på många fördelaktiga mjölkkvalitetsalleler; man har hos dessa varken lyckats påvisa *FMO3* X-allelen eller κ -kasein E-allelen och de kan inte minst ur denna aspekt med fördel användas i aveln. Förekomsten i rödkullerasen av X och E-allelerna kan eventuellt bero på tidigare användning SRB-sperma, något som delvis stöds av avsaknaden av dessa alleler bland de undersökta tjurarna av östnorskt ursprung. Användning av östnorska tjurar torde således bidra till att minska frekvenserna av de icke önskvärda allelerna. För att upprätthålla en tillfredsställande genetisk variation hos rödkullerasen är det därtill en fördel att hålla stamboken öppen för närbesläktade raser såsom den östnorska rödkullan.

INTRODUKTION

Rödkullan är en utrotningshotad ras och i dagsläget finns ungefär 1 100 renrasiga djur (Torén, 2005). Rödkullan var i början av 1900-talet en av Sveriges mest populära raser på grund av att den ansågs vara mer lämpad för svenska förhållanden än importerade raser. Rasens avkastning i början av 1900-talet var relativt blygsamma 1500 kg/år. I förhållande till sin ringa storlek och den ofta knappa utfodringen var de dock förhållandevis goda mjölkproducenter. Rasen är känd för sin hållbarhet och för att fungera bra i betesdrift under svenska klimatförhållanden (Larsson, 2004). Rödkullan används både som mjölk- och köttproducent.

Rödkulleföreningens mål är att bevara rödkullan som en livskraftig ras. Föreningen vill även öka intresset för rasen så att den i framtiden ska kunna återfinnas i både små och stora besättningar (Gustafsson & Thoren, 2002). Denna undersökning av rödkullans genotyp vad gäller mjölk kvalitets egenskaper ingår som en del av bevarandearbetet som görs för rasen. Genom att undersöka rasens genuppsättning vad gäller specifika egenskaper såsom mjölk kvalitet kan fördelaktiga egenskaper uppdagas, som i framtiden kan utvecklas och användas i en nischinriktad produktion och därmed öka rödkullans konkurrenskraft.

Länge har mjölkproduktionen varit inriktad på att producera så mycket som möjligt till minsta möjliga kostnad. Detta synsätt har nu börjat förändras. Idag finns det ett ökande intresse även för kvaliteten hos lantbrukets produkter. Marknaden för mjölkprodukter har under de senaste årtiondena ändrats från att mejerierna bestämde vad som producerades till att det nu istället är konsumenterna som styr urvalet. Konkurrensen från utlandet har även blivit större, vilket gör att konsumenterna har ett mycket stort utbud av mejeriprodukter att välja mellan. Detta gör att högre krav ställs på mjölk kvaliteten och kunderna intresserar sig idag mer för smak, textur, närings- och hälsoaspekter. För mejerierna betyder det att processegenskaperna hos mjölken och innehållet av protein och fett blir allt viktigare. β -kasein, κ -kasein, β -laktoglobulin och *DGATI* är gener som har stor inverkan på processegenskaper och ostutbyte i mjölk (se sammanfattning av Lundén, 2005), medan räkgenen *FMO3* styr uppkomsten av ett genetiskt betingad smakfel hos mjölk vars orsak uppdagades för några år sedan (Lundén *et al.*, 2002^a).

Litteraturstudien beskriver hur rödkullan förhåller sig till andra raser vad det gäller allelfrekvenser i olika loci som styr mjölkens sammansättning och kvalitet. Bland annat beskrivs allelers påverkan på mjölkens processegenskaper. Syftet med att undersöka förekomsten av olika alleler i ett visst locus hos en utrotningshotad population är att den förhoppningsvis ska säga någonting om populationens ursprung, graden av ärftlig variation inom populationen och ärftliga skillnader mellan grupper av djur, men även för att visa rasens speciella egenskaper, tex. avseende mjölk kvalitet (Gustafsson & Thoren, 2002).

LITTERATURSTUDIE

Rödkullor

Historik om rödkullerasen

Rödkullan är en gammal ras av svenskt ursprung med sin främsta utbredning i mellersta Sverige. Rasen omnämns för första gången 1842 i en notering från Västergötland (Hedling, 1987). I slutet av 1800-talet inleddes en import av utländska raser eftersom man ville höja avkastningen hos de inhemska raserna. De importerade raserna förde dock med sig nötkreaturstuberkulos till Sverige. Rödkullan fick ett rykte om sig att vara resistent mot tuberkulos, vilket dock inte var sant. Detta fick dock som effekt att spridningen av Ayrshire och Rödbrokig svensk boskap (RSB) bromsades upp, samtidigt som den medförde en tillfällig uppgång i antalet kor av rödkullerasen (Hallander, 1994). Konkurrensen hårdnade emellertid från andra, mer högvakastande raser och de rödkullor som finns idag utgör bara en spillra av den allmogeko som fanns innan främmande raser började importeras (Hedling, 1987).

Omkring 1910 rapporterades iakttagelser av besättningar med röda, kulliga kor, bland annat i Bohuslän, Svärdsjö i Dalarna och på bergsmansgårdarna runt Falun. Vid ett lantbruksmöte i Rättvik 1912 bestämdes att en avelsförening för rödkullor skulle bildas. Svärdsjörödkullorna var de första som kom att sprida sig inom rödkullerasens blivande utbredningsområden. Svärdsjötjuror användes till lantrasdjur med i vissa fall stor inblandning av Ayrshire. Flera kor såldes från Svärdsjö till olika områden, men det har visat sig att de flesta av dessa kor har försvunnit utan att lämna några spår efter sig i stamtavorna hos dagens rödkullor, eftersom de inte kunde hävda sig avkastningsmässigt gentemot korsningsdjuren. Rödkullorna höll på att försvinna redan runt 1912, eftersom rasen korsades med andra importerade raser såsom Ayrshire och Galloway. Under de två följande decennierna bedrev Sveriges Rödkulleförening ett intensivt avelsarbete, med gruppavel, vilket medförde att den gamla lantrasen förbättrades vad gäller avkastningen (Hedling, 1987; Hallander, 1994) och storlek (Hallander, 1994). De tre grupper av tjuror som användes mest kom från Svärdsjö, Storgården i Aspeboda och två besättningar i Grycksbo och Lindesberg. Dessa besättningar hade byggts upp på inavlade stammar från gamla bergslagskor. År 1924 tillkom även Ellesbobesättningen som innebar att man fick en fjärde tjurgrupp att korsa korna med. Gruppavel innebär en mildare form av inavel inom grupper och där man genom korsning mellan grupper tar fram bruksdjur. Gruppavel används för att öka bruksdjurens vitalitet och produktivitet. Problemet med denna typ av avel är att om grupperna blir för små kommer inavelsdepression uppstå och därmed blir möjligheterna att bedriva riktad selektion mindre än om man låtit samtliga djur utgöra en enda, större population (Johansson & Rendel, 1963). Just inavelsdepression blev senare ett problem i rödkullepopulationen (Hedling, 1987).

Nordiska rödkullor

Vestland- och Östlandsfeet

Både vestland- och östlandsfeet är raser som är skapade under de senaste hundra åren. Varken vestland- eller östlandsfeet var enhetligt kulliga eller hade enhetligt röd färg från början. Vestlandsfeet bildades under 1890-talet och är en sammanslagning av flera raser; röd kullig vestlandsras, jaeder- och lyngdalsslaget samt västländsk fjordboskap. År 1985 fanns ungefär 25 kor kvar och ett tiotal tjuror. Östlandsfeet, som även kallas raukollerne, är spridd över nationsgränserna och är mycket nära släkt med den svenska rödkullan. Denna ras bildades efter 1890 av boskapsstammar i Akershus och Östfolds fylken. Mellan åren 1920-1923 importerades östnorska rödkullor till några stora besättningar i Håkansberg, Sälboda (Arvika),

Årjäng och Tumba och från dessa besättningar såldes senare en del tjurar som var i det närmaste obesläktade med de övriga grupperna av rödkullor i Sverige. År 1982 importerades 48 djur till Sverige. Dessa östnorska rödkullor trodde man var de sista av sitt slag, men senare hittades ytterligare en besättning som dock verkar vara den sista återstående (Hallander, 1994).

Finska rödkullor

Den västfinska rasen har sedan 1920-talet beskrivits som en kullig ras med gulröd färg, oftast ljusare än de svenska rödkullorna (Hallander, 1994). De goda produktionsegenskaperna gjorde att rasen var mycket populär i Finland. De bästa korna kunde producera 9 000 kg mjölk redan under 1920-talet! (Hallander, 1994). De små populationerna av nordfinsk och östfinsk rödkulla slogs officiellt ihop med den västfinska i slutet av 60-talet och denna ras kallas idag oftast för finsk boskap eller finsk rödkulla. I början av 1970-talet var den västfinska rasen Finlands till antalet största ras med 110 000 djur. Dock har populationsstorleken rasat och ungefär 3 600 djur av de tre raserna sammantaget fanns kvar 1987 varav den största delen består av västfinsk rödkulla, vilket numerärt är i nivå med vår fjällras. De finska djuren kom att få stor inverkan på sin svenska motsvarighet. År 1939 importerades två tjurar av västfinsk ras till Sverige. Dessa tjurar blev betydelsefulla eftersom de höjde fetthalten i mjölken hos sina döttrar. Djuren ökade även i storlek, men dock inte i mjölkavkastning. Båda tjurarna gav döttrar med goda anlag vilket gjorde att man ställde sig positiv till vidare importer. Fler tjurar importerades och under 1945-75 stambokfördes 531 rödkulletjuror, varav 16.8 % hade en finsk importtjur till far (Hallander, 1994).

Avelsföreningen för rödkullor

Avelsföreningen för Fjällras och Rödkulleföreningen slogs samman 1938 och bildade SKB-föreningen. Detta gjordes främst av administrativa och ekonomiska skäl, men även på grund av att lantbruksstyrelsen ansåg det vara opraktiskt med två, som man trodde, så närbesläktade raser. Sammanslagningen var tänkt att vidga avelsbasen för de kulliga lantraserna. Efter sammanslagningen benämndes samtliga djur för svensk kullig boskap (SKB). Det visade sig snart att genutbytet mellan rödkullor och fjällkor inte blev så stort som man hade trott och någon egentlig sammanslagning av raserna skedde aldrig, eftersom det fanns djurägare som värnade om renrasigheten (Larsson, 2004). För dessa djurägare blev i stället den västfinska rödkullerasen ett intressant alternativ för att bidra med nytt "blod" och det startades en import i liten skala från de bästa avelsbesättningarna i Finland.

Seminteknikens introduktion i början av 1960-talet höll på att bli rödkullerasens död. Detta berodde bland annat på att av de befintliga 140 rödkulletjurarna introducerades inledningsvis bara fyra tjurar i semin; Monrad, Noak, Greger och Werner. Något år senare tillkom även 13 Linus. Ingen av de fyra första tjurarna var avkommebedömda då de sattes i avel och det visade sig senare att dessa djur hade låga avelsvärden. Djurägarna tvingades till slut att börja seminera med svensk röd och vit boskap (SRB), på grund av stora problem med inavelsdepression. Denna SRB-inblandning innebar dock att den renrasiga rödkullan mycket snabbt korsades bort (Larsson, 2004). Dock återkorsades en del av SRB x rödkullekorsningarna med rödkullor (Larsson, 2005. pers. med). Vid seminstarten fanns det ungefär 4 000 rödkullor i Dalarna och samtliga av dagens avkommor till dessa djur har visat sig vara släkt med tjurarna 13 Linus, 19 Luja och 201 Meister. Linus hade en ren svensk härstamning, Luja ren västfinsk härstamning och Meister bar 50 % finsk och 50 % svensk härstamning. Vid en inventering i början av 1970-talet fanns bara 400 rödkullor kvar i Sverige och rasen fortsatte att minska i antal. 1977 fanns det 23 rödkullor kvar medan 1979 var det bara 18 hondjur och en avelstjur (13 Linus) kvar. Alla rödkulleägare kontaktades då och de

informerades om vikten av att bevara rasen. Därefter började situationen för rödkullorna långsamt förbättras. Spermadoser började frysas in efter de renrasiga rödkulletjurar som fanns att tillgå. De första västnorska rödkullorna började importeras till Sverige år 1981. Den norska stammen hade på blott 15 år minskat dramatiskt från 200 000 djur till ungefär 75 (Hedling, 1987).

En riksomfattande rödkulleförening startades 1984 och denna förening ligger, organisatoriskt sett, fortfarande under SKB-föreningen. Föreningens uppgift är att stambokföra alla hondjur och att övervaka att sperma fryses in efter tjurar som representerar olika släktlinjer. År 2000 fanns det sperma lagrad från ett 60-tal tjurar i genbank eller hos seminföreningarna. Antalet hondjur hade 1984 ökat till 100 kor och 2001 var antalet uppe i ungefär 500 renrasiga hondjur (Larsson, 2004). År 2005 söktes lantrasstöd för 1 100 rödkullor (Torén, 2005. pers.med)

Den moderna rödkullans kännetecken

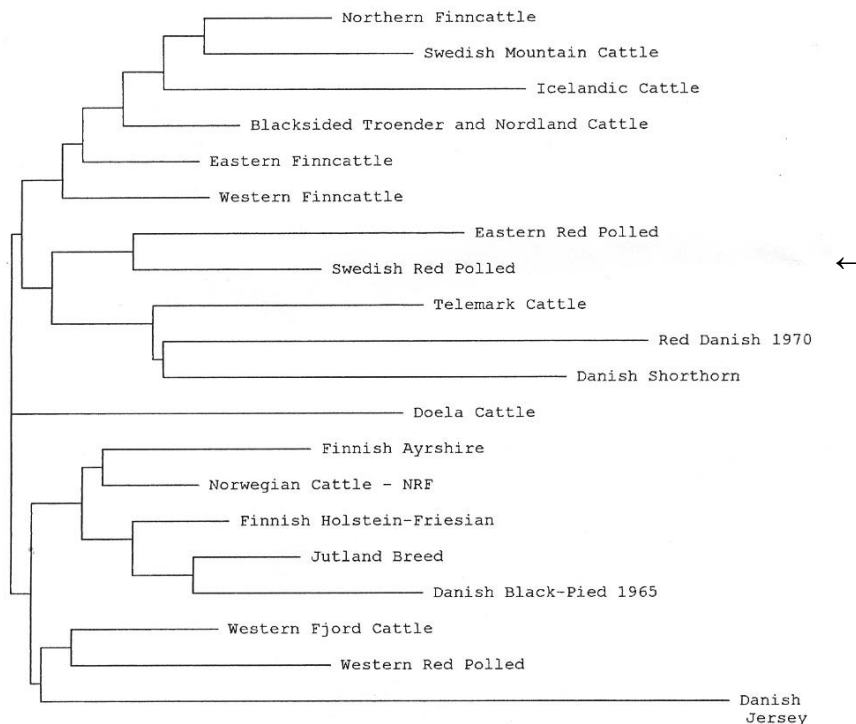
Rödkullan används idag både som kött- och mjölkproducent. Det är en hornlös ras, men lösa hornknabbar kan förekomma (Larsson, 2004). Fördelen med att ha hornlösa djur är att de inte kan orsaka lika stor skada på djurskötare eller andra djur, och därmed hudarna, som djur med horn. Hornlösheten är ett autosomalt dominant anlag, vilket innebär att egenskapen är lika vanlig hos han- som hondjur och att både djur som är homozygota och heterozygota för anlaget är hornlösa. Genen för hornlöshet har lokaliserats till nötkreaturens kromosom 1 (Georges *et al.*, 1993; Brenneman *et al.*, 1996). Nedärvingen av lösa hornknabbar är mer oklar. Enligt White & Ibsen (1936) styrs förekomsten av lösa hornknabbar av ett särskilt locus med två alleler, Sc (hornknabbar) och sc (inga hornknabbar). Färgen på rasen är röd i olika nyanser, oftast helröd men även vita tecken kan förekomma. Rödkullan har ett livligt temperament, gott lynne, god hållbarhet, starka ben och klövar, god fruktsamhet, lätta kalvningar och det anses allmänt att rasen är fri från flertalet av de ärftliga defekter som hittills identifierats i andra raser. Storleken på vuxna rödkullekor varierar mellan 350-600 kg och slaktvikter på handjuren brukar ligga mellan 250-350 kg (24 mån) (Sveriges Rödkulleförening). Rödkullor är goda betesdjur som visar stor köldhärdighet och kan hållas ute året runt, om de yttre miljöförhållandena i övrigt tillåter detta. Fortplantning skall enligt Rödkulleföreningens stadgar endast ske på naturlig väg. Artificiell inseminering accepteras dock, men embryoöverföring tillåts inte (Larsson, 2004). Medelavkastningen för en rödkulla är 5 000 kg mjölk per laktation, med en fetthalt på 4 % (Sveriges Rödkulleförening).

Rödkulleavel

Beroende på ursprung indelas dagens rödkullor i fyra varianter: svensk, östnorsk, västnorsk och finsk rödkulla. En viss inblandning av ovannämnda tre ”icke-svenska” rödkullor har skett i den svenska rödkullerasen och dessa ”rödkullekorsningar” används idag även i aveln för att motverka inavel. För att få kallas rödkulla kräver Sveriges Rödkulleförening att djuret har renrasiga anor i tre generationer (Sveriges Rödkulleförening). Rödkulleföreningens styrelse bestämde 2003 att rödkullerasen ska bevaras med utgångspunkt från hur rasen ser ut idag och bara tillåta ”en naturlig utveckling”, dvs ingen artificiell selektion, ”med hänsyn tagen till harmoni mellan olika egenskaper” (Larsson, 2003). Rödkulleföreningen har bestämt att endast djur som är anslutna till officiell härstamningskontroll ska ingå i genbanker för rödkullor. Föreningen anser att någon import av västfinsk och västnorsk rödkulla inte längre är aktuell eftersom antalet rödkullor och spermatillgången från olika tjurlinjer är så pass stor (Larsson, 2004).

Figur 1 visar ett fylogenetiskt rasträd, som illustrerar hur de olika nordiska mjölkkoraserna är besläktade (Kantanen *et al.* 2000). Enligt detta är den svenska rödkullan närmast släkt med

den östnorska rödkullan. Telemarksboskap är också relativt nära besläktad med den svenska rödkullan, medan den västnorska rödkullan endast är avlägset släkt med den svenska. Något överraskande är rödkullan närmare släkt med Red Danish och Danish Shorthorn än med den västnorska rödkullan.



Figur 1. Fylogenetiskt rasträd som illustrerar släktskapen mellan 20 nordeuropeiska boskapsraser av huvudsakligen mjölktyp (Kantanen *et al.*, 2000). Rödkullans position i rasträdet är utmärkt med en pil.

Rödkulleföreningens främsta målsättning är att öka antalet individer inom rasen och bredda avelsbasen genom att avla på så många moderlinjer som möjligt (Larsson, 2004). Avelsdjuren ska väljas på basis av härstamning och inte mjölkproduktion (Gustafsson & Thoren, 2002). Denna strategi medför att någon selektion för specifika mjölkproduktionsegenskaper inte görs. Aveln ska vara generellt inriktad på att uppnå friska och sunda djur med en för rödkullan typisk karaktär av svensk-östnorsk typ. Rödkullor ska inte tas ur avel på grund av alltför låg mjölkproduktion, utan ska då i stället användas som diko eller "hushållsko". Utgallring ska bara ske av djur som har uppenbart negativa egenskaper eller defekter (Larsson, 2004).

Bevarande av små populationer

Rödkullan tillhör en utrotningshotad ras och det framförs flera skäl till att rasen bör bevaras. Raser med unik evolutionär historia kan vara värdefulla för bevarandet av genetisk diversitet på artnivå, vilken kan komma till användning vid ändrade produktionsförhållanden, ändrad miljö eller ändrad inriktning av produktionen. Att kunna bemöta förändringar i ekonomi och/eller produktionsförhållanden är välmotiverade skäl till bevarande av en ras (Rendel, 1995). Raser som är relativt obesläktade med moderna mjölkkor kan ha egenskaper som kan användas för att förbättra dagens högproducerande raser. Korsningsavel kan även bedrivas för att utnyttja heterosiseffekter. En konsekvens av kravet på ökad produktion inom lantbruket är

annars att de lokala raserna de senaste årtiondena fått stiga åt sidan till förmån för Ayrshire- och Holstein-Friesian baserade raser (se sammanställning av Kantanen *et al.*, 2000).

I forskningssammanhang kan tillgång till försöksdjur av relativt oförädlade raser vara värdefullt. Exempelvis kan mätning av avelsframsteget göras med hjälp av ursprungliga lantraser och delpopulationer. För forskning inom evolution, beteendevetenskap och inom undervisning i husdjursvetenskap kan udda populationer spela en viktig roll (Maijala, 1982). Andra menar att bevarandet av en husdjurspopulation är lika viktigt som att bevara andra kulturarv (Rendel, 1995).

Man bör eftersträva att bevara en ras i form av levande djur, eftersom rasen då kan anpassa sig till nya förhållanden som uppkommer. Till exempel kan populationen gradvis utveckla motståndskraft mot nya sjukdomar. Djur som tas fram från en genbank ges inte möjlighet till denna gradvisa anpassning och rasen riskerar att dö ut på grund av bristande motståndskraft mot nya patogener. Dessutom glöms inte en ras med levande individer bort på samma sätt som om rasen bara existerat som spermier och ägg i en genbank (Jordbruksverket, 1980).

Gener med stor inverkan på mjölk kvalitetsegenskaper

Troligtvis styrs många av mjölk kvalitetsegenskaperna av ett begränsat antal gener. Studier av vilka mekanismer och biologiska förlopp som kontrollerar intressanta kvalitetsegenskaper kommer i framtiden ge större insikt om vilka gener som är involverade. Flera gener med stor effekt på mjölk kvalitetsegenskaper har redan identifierats, exempelvis är β -kasein, κ -kasein och β -laktoglobulin gener som har stor påverkan på processegenskaper och ostutbyte i mjölk (se sammanställning av Lundén *et al.*, 2005).

Mjolkproteiner

Mjölks torrs substans består huvudsakligen av fem fraktioner vilka utgörs av kolhydrater, lipider, protein, icke-protein kväve (NPN) och mineraler. Mjölken innehåller även låg andel av komponenter såsom vitaminer, enzymer och spårelement. De variationer som finns i mjölksammansättningen beror på ett antal faktorer av vilka somliga är kopplade till den individuella kon. Faktorer som kons genuppsättning, dräktighetsstadium, östruscykel, metaboliska sjukdomar och tidpunkt i laktationen men också faktorer som foder, skötsel och inhysning påverkar mjölksammansättningen (se sammanställning av Allmere, 1998).

Protein är den ekonomiskt mest intressanta komponenten i mjölk, framförallt vad gäller vidareförädlade mjölkprodukter, och står för mer än 20 % av det dagliga per capitaintaget av protein. Mjolkproteinerna indelas i två grupper utifrån deras löslighet vid pH 4.6. De proteiner som fälls ut vid pH 4.6 kallas kaseiner medan de som förblir i lösning benämns vassleproteiner (se Gustavsson, 2001). Mjolk från kor innehåller ungefär 3.5 % protein, varav 80 % av proteinet är kasein och 20 % är vassleprotein (se Allmere, 1998). Mjölks kombination av kasein och vassleprotein resulterar i en ur näringssynpunkt närmast perfekt balans vad gäller aminosyrintag. Mjolkproteiner har ett överskott av essentiella aminosyror, såsom lysin (Lys), treonin (Thr), metionin (Met) och ileucin (Ile), vilket gör att mjolkproteiner lämpar sig bra för att komplettera vegetabiliska proteiner vilka ofta innehåller begränsat med essentiella aminosyror. Det finns sex huvudkategorier av mjolkproteiner vilka förekommer i olika, genetiskt betingade varianter: α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein, κ -kasein, α -laktalbumin och β -laktoglobulin.

Tabell 1. De sex vanligaste mjölkproteinerna samt deras andel i kasein och vassleprotein. De i svenska mjölkcoraser vanligaste mjölkproteinallelerna anges.

Kasein	Andel % av kasein	Allelvarianter
α_{s1} -kasein	38	B, C
α_{s2} -kasein	10	A
β -kasein	36	A1, A2, A3, B
κ -kasein	13	A, B, E
Vassleprotein	Andel % av vassleprotein	
α -laktalbumin	20	B
β -laktoglobulin	50	A, B

Källa: sammanställning av Walstra & Jennes, 1984, Mercier & Grosclaude, 1999 och Formaggioni *et al.* 1999.

Kaseiner

Kaseiner är fosfatrika och relativt hydrofoba proteiner med rak sekundär struktur. Den raka strukturen medför att de är känsliga för proteolytiska enzymer, men också att de är värmetåliga och klarar hög processtemperatur utan att förändras märkbart. Kaseinerna har ett högt innehåll av opolära aminosyror (valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin och prolin) vilka borde göra kaseinerna svårslösliga i vatten, men det höga innehållet av fosfatgrupper gör att de ändå är relativt lösliga (Fox & McSweeney, 1998). κ -kasein består av 169 aminosyror och har en molvikt på 19 000 Da, medan β -kasein består av 209 aminosyror med en molekylvikt på 23 983 Da. β -kasein har en hydrofob karaktär och vid rumstemperatur är proteinet känsligt för kalciumjoner. β -kasein kan delas upp genom plasminernas proteolytiska aktivitet i mjölk i γ -kasein och proteos-peptoner (Formaggioni *et al.*, 1999). κ -kasein består av en blandning av polymerer, som troligen hålls samman med intermolekylära disulfidbindningar. κ -kasein är känsligt för chymosin och även andra proteaser. Chymosin hydrolyserar Phe (105)-Met(106) bindningen och då bildas ett fragment som kallas para- κ -kasein. Denna reaktion utgör grunden för bildningen av ostmassa. κ -kasein skiljer sig markant från de övriga kaseinerna vad gäller löslighet (Fox & McSweeney, 1998).

Kaseingenerna bildar ett komplex ungefär 200 kb stort som ligger på kromosom 6. Den inbördes ordningen mellan de olika kaseingenerna är α_{s1} - β - α_{s2} - κ (Threadgill & Womack, 1990) där avstånden mellan locina α_{s1} - β är ca 20 kb, β - α_{s2} är ca 70 kb och α_{s2} - κ ligger 95-120 kb ifrån varandra (Rijnkels *et al.*, 1997).

β -laktoglobulin

Vid normalt mjölk-pH (pH 6,5) hos idisslare förekommer β -laktoglobulin som en dimer, där varje monomers molekylvikt är 18 400 Da (Gustavsson, 2001). Idisslarmonomeren av β -laktoglobulin består av en polypeptidkedja av 162 aminosyror som innehåller fem cysteinrester. Fyra av dem bildar disulfidbindningar medan den femte är en fri tiolgrupp. Den fria tiolgruppen har stor betydelse för de förändringar som uppkommer vid upphettning av mjölken eftersom den då reagerar med andra proteiner, främst κ -kasein och α -laktalbumin (Walstra & Jennes, 1984).

Mjölkproteinernas genetiska polymorfism

Genetisk polymorfism betyder att det förekommer minst två alternativa varianter (alleler) inom ett genlocus (genotypen i ett locus med allelerna A och B kan exempelvis utgöras av AA, AB eller BB). Mjölkproteinvarianterna styrs av gener som visar kodominant nedärvning (se sammanställning av Formaggioni *et al.*, 1999). Att nedärvningen är kodominant innebär att heterozygoten uttrycker båda alleler i ett locus. Exempelvis uttrycker en ko som är

heterozygot AB i κ -kasein locus både A- och B-varianterna av mjölkproteinet κ -kasein i mjölken. Oftast kan kons mjölkproteingenotyp härledas utifrån motsvarande, i mjölken befintliga proteinvarianter. De genetiska varianterna av ett enskilt protein skiljer sig oftast från varandra genom några få aminosyrasubstitutioner (se bilagorna 1, 2, och 3) och de förekommer i varierande frekvens hos olika mjölkkoraser. De olika varianterna har visat sig vara kopplade till förändringar i mjölksammansättningen och kan därigenom påverka de mjölkteknologiska egenskaperna (se sammanställning av Lundén 2005). Hos β -laktoglobulin har man funnit allelspecifika skillnader i promotorregionen. Studier visar att en förändrad transkription är huvudorsaken till att β -laktoglobulin A-varianten förekommer i större mängd i mjölken jämfört med B. En förklaring till fenomenet är att promotorregionen hos β -laktoglobulin A-allelen har en högre affinitet för transkriptionsfaktorer och därför uttrycks mer effektivt (Lum *et al.*, 1997). Sammanfattningsvis kan sägas att vilken typ av protein som en ko kan bilda i mjölken avgörs av hennes mjölkproteingenotyp, dvs genetiskt betingade skillnader i mjölkproteinets struktur, medan transkriptionsaktiviteten och mRNA-stabiliteten påverkar mängden protein som produceras (Prosser *et al.*, 2000).

Genetiska varianter av κ -kasein, β -kasein och β -laktoglobulin

De olika proteinvarianterna som hittills har påträffats av κ -kasein är A, B, C, E, F och G (sammanställning av Formaggioni *et al.*, 1999; af Forselles *et al.*, 1998; se även bilaga 1). Alla dessa varianter har uppkommit efter mutationer i exon 4 av genen. De olika varianterna förekommer i varierande utsträckning inom olika raser. Hos SRB och SLB är A-varianten vanligast. E-varianten har påträffats hos flera raser, men allelfrekvensen ligger oftast under eller i närheten av 5 %. Två undantag är Finsk Ayrshire med en allelfrekvens på 0,31 (Ikonen *et al.*, 1996) och SRB med 0,22 (af Forselles *et al.*, 1998).

Aschaffenburg (1961) var den som först upptäckte polymorfism hos β -kasein. Genom elektrofores vid basiskt pH kunde tre olika β -kaseinband urskiljas. Dessa varianter kallas A, B och C (Aschaffenburg, 1961; se även bilaga 2). Vid en annan undersökning några år senare gjordes en elektrofores vid surt pH. Undersökningen visade då att A-bandet inte bara var en kaseinvariant utan tre olika varianter, som benämndes A1, A2 och A3. Enligt en sammanställning av Formaggioni *et al.* (1999) finns nu 16 accepterade varianter av β -kasein.

Aschaffenburg & Drewry (1957) var de första som iakttog olika varianter av β -laktoglobulin i mjölk. Sedan dess har man funnit tolv genetiska varianter hos nötkreatur (Formaggioni *et al.*, 1999). A och B är de två vanligaste förekommande proteinvarianterna av β -laktoglobulin. Dessa två varianter skiljer sig genom två aminosyrautbyten, i position 64 respektive position 118 (se även bilaga 3). A-varianten har asparginsyra respektive valin i dessa positioner medan B-varianten har glycin respektive alanin (Eigel *et al.*, 1984).

Allelfrekvenser

κ -kasein: De flesta europeiska raser har höga frekvenser av κ -kasein A. Det finns dock undantag såsom Brown Swiss, Simmental, Fjällras och Jersey, som har en relativt hög frekvens av κ -kasein B (se sammanställning av Lien *et al.*, 1999). κ -kasein E-allelen kan ha sitt ursprung från Ayrshirepopulationer eftersom höga frekvenser (0,31) rapporterats hos Finsk Ayrshire (Ikonen *et al.*, 1996). E-varianten är även vanlig i rasen US Holstein där Leone *et al.* (1998) redovisar en frekvens på 0,11, och John R. Woollard, University of Wisconsin (2001, *personligt meddelande*) en frekvens på 0,16. De flesta studier, som gjorts avseende κ -kasein inkluderar inte tester för E-varianten och därför saknas kännedom om frekvenserna av denna allel hos flertalet raser. I en studie av Lien *et al.* (1999) som gjordes på

nordiska mjölkcoraser visades att κ -kasein A var den variant som hade den högsta frekvensen i de flesta raser med några få undantag där κ -kasein B var vanligare, tex. isländsk boskap (0,76) och Northern Finncattle (0,71), Fjällras (0,71) och Eastern Finncattle (0,57). Den högsta frekvensen av κ -kasein E hittades i finsk Ayrshire (0,33) och Rödkulla (0,20). I studien av SRB-tjurar uppmättes en frekvens av E-allelen på 0,22 (af Forselles *et al.*, 1998). Resultaten från studien av Lien *et al.* (1999) visar att det i flertalet fall finns betydande skillnader i allelfrekvenser mellan moderna och gamla raser. Det är exempelvis oftast högre frekvenser av κ -kasein B hos lantraser jämfört med moderna raser, men det finns även skillnader i förekomsten av κ -kasein E allelen där denna variant är vanligare hos de moderna raserna. Teoretiskt sett kan den intensiva selektion för mjölkavkastning som genomförts under de senaste 30 åren ha påverkat frekvensen av en mjölkproteinallel som förekommer i kopplingsojämvikt med en allel i ett kopplad locus som styr mjölkavkastning. En stor variation i allelfrekvenser av κ -kasein har observerats inom en grupp av gamla nordiska lantraser. Danish Shorthorn uppvisar exempelvis en frekvens på 0,14 för κ -kasein B-allelen medan frekvensen för samma allel uppgår till 0,76 hos isländsk boskap (Lien *et al.*, 1999). Detta indikerar att frekvensen av κ -kaseinallelen påverkas även av andra faktorer än selektion för mjölkavkastning (Lien *et al.*, 1999). Slumpmässig genetisk drift är en faktor som kan medföra att en viss allel av ren slump blir vanligare. Genetisk drift kan exempelvis uppkomma då en tjur som råkar bära en viss allel används förhållandevis intensivt i aveln, och effekten blir större ju färre individer som fortplantar sig i populationen.

I två studier av Lundén *et al.* (1997) och Janson *et al.* (1993) undersöktes frekvenserna av de olika mjölkproteinvarianterna hos de två svenska raserna SLB och SRB. Tabell 2 visar att κ -kasein A är den vanligaste varianten hos båda raserna. Ur tabell 2 framgår att allelfrekvensen för κ -kasein B är avsevärt högre för svensk Jersey (SJB) och SKB än för SRB och SLB. I dessa studier undersöktes inte κ -kasein E-locuset.

β -kasein: De två vanligast förekommande varianterna av β -kasein är A1 och A2, av vilka A1-varianten är vanligast hos de flesta nordeuropeiska raser. Den högsta frekvensen av A2 återfinns hos Guernseyrasen. B-allelen förekommer bara i låga frekvenser hos nästan alla undersökta populationer, där den högsta frekvensen återfinns hos populationer besläktade med Brown Swiss och hos Jerseypopulationer. A3-allelen förekommer i låg frekvens i ett flertal nordeuropeiska raser. Rödkullor har en något högre frekvens av A1 än A2 och en låg frekvens av B-varianten medan ingen A3-allel påträffades i populationen (Tabell 2). Vad beträffar SRB och SLB visar studierna av Lundén *et al.* (1997) och Janson *et al.* (1993) att frekvenserna av A1- och A2-allelerna är relativt lika (Tabell 2).

β -laktoglobulin: Hos SRB och SLB är B-varianten av β -laktoglobulin något vanligare än A-varianten (Gustafsson *et al.*, 1998; Lundén *et al.*, 1997; Janson *et al.*, 1993), ett förhållande som även iakttagits hos de flesta nordiska och europeiska mjölkcoraser. Undantagen var svartbrokig dansk mjölkcoras och västnorsk rödkulla som hade högre frekvenser av β -laktoglobulin A (Lien *et al.*, 1999). Rödkullor från olika populationer uppvisade i samma undersökning en stor variation i frekvenser av de olika β -laktoglobulin-varianterna (Tabell 2).

Tabell 2. Allelfrekvenser (%) för κ -kasein, β -kasein och β -laktoglobulin hos några svenska och norska koraser.

Locus	Allel	ROK ³	SFR ³	VRA ³	ORA ³	SKB ²	SLB ³	SRB ³	SLB ¹	SLB ²	SRB ¹	SRB ²
Antal djur		28	35	36	11	418	41	37	204	304	371	689
κ-kasein	A	34	29	63	77	38	73	72	80	87	83	83
	B	46	71	38	23	62	18	16	20	13	17	17
	E	20	0	0	0	-	9	12	-	-	-	-
Antal djur		31	33	35	10	418	43	39	204	304	371	689
β-kasein	A1	48	44	44	40	40	41	40	46	44	46	51
	A2	47	52	56	60	56	59	60	53	53	53	48
	A3	0	0	0	0	0	0	0	0,2	1	0,1	0,1
	B	5	5	0	0	4	0	0	0,8	2	0,8	1
Antal djur		31	34	36	11	418	42	39	204	304	371	689
β-laktoglobulin	A	16	37	54	36	26	46	30	50	48	33	41
	B	84	63	46	64	74	54	70	50	52	67	59

(ROK=svensk rödkulla, SFR= svensk fjällras, VRA= västnorsk rödkulla, ORA= östnorsk rödkulla, SKB=svensk kullig boskap)

¹: Lundén *et al.*, 1997

²: Janson *et al.*, 1993.

³: Lien *et al.*, 1999.

Effekter av κ -kasein polymorfism

Det har i några undersökningar visats att den genetiska varianten κ -kasein B bidrar till 10-20 % högre κ -kaseinkoncentrationer i mjölken jämfört med A-varianten (McLean *et al.*, 1984; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986). Ng-Kwai-Hang *et al.* (1984) visade att BB-kor producerar 12 kg mer protein per laktation än vad A-homozygoter gör. Samma undersökning visade även att mjölkavkastningen inte påverkades signifikant av olika κ -kaseinvarianter, medan Bovenhuis *et al.* (1992) rapporterat att A-allelen är associerad med hög mjölmängd. När de olika kaseinkomponenterna uttrycks som procent av det totala kaseinet visades att κ -kasein BB mjölk hade signifikant lägre andel av α_{s1} -kasein och högre andel av κ -kasein (Schaar, 1984). κ -kasein B medför ett högt innehåll av totalkasein (Schaar, 1984; Ikonen *et al.*, 1997), högt κ -kaseininnehåll (Ikonen *et al.*, 1997) och små kaseinmiceller (Lodes *et al.*, 1996).

En positiv effekt av κ -kasein B-allelen på totalproteinhalten i mjölk har observerats i vissa studier (Ikonen, 1997; Bovenhuis 1992), medan andra studier inte kunnat påvisa någon effekt av B-allelen på proteinhalten (Lundén *et al.*, 1997; Ojala *et al.*, 1997).

Effekter av β -kasein polymorfism

Vid en undersökning av hur β -kasein-polymorfism påverkar totalproteinhalten fann man inga signifikanta skillnader. Dock fann man att kor med AB-varianten hade signifikant högre vassleproteinhalt i mjölken jämfört med kor homozygota för A. I denna undersökning fann man dock inga kor med BB-genotypen (Felenczak *et al.*, 1983). När McLean *et al.* (1984) undersökte proteinsammansättningen mellan kor med olika β -kasein-varianter fann man flera skillnader. Genotyperna A1B och A2B hade signifikant högre koncentration och proportion β -kasein än övriga varianter. Homozygoter för B-varianten hade signifikant lägre α_{s1} -kasein halt (B<A1 och A2) och högre κ -kasein halt (B>A2) (McLean *et al.*, 1984). I en studie av Ng-Kwai-Hang *et al.*, (1987) visades att A2B-kor hade lägst halt β -laktoglobulin och immunoglobulin (Ig), men högst halt α -laktalbumin. I denna studie hade β -kasein B större positiv inverkan på den totala proteinhalten än β -kasein A1, A2 och A3. De kor som

hade högst mjölkavkastning var bärare av β -kasein A3-allelen och när A1 jämfördes med A2 iaktogs en något högre avkastning hos A2-kor (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984). I en studie av McLean *et al.* (1984) visades signifikanta skillnader i fettinnehåll hos de olika β -kaseinvarianterna, där β -kasein BB, A1B, och A2A2 medförde högst fetthalt och A1A2 hade lägst fetthalt (McLean *et al.*, 1984). Ng-Kwai-Hang *et al.* (1987) fann att A1B-fenotypen var kopplad till högst fetthalt och fettavkastning. Resultaten från Lundén *et al.* (1997) studie visar att β -kasein A1A1 var associerad med lägre mjölk-, kasein-, protein- och laktosmängd hos SRB. Hos SLB var dock inte denna koppling signifikant.

A1- och B-varianten har påståtts kunna orsaka diabetes typ 1, vilket skulle bero på att dessa proteinvarianter klyvs av matsmältningsenzymerna i tarmen vid position His 67 vilket ger upphov till peptiden β -casomorfïn 7 som tas upp i tarmen. Studier tyder på att β -casomorfïn 7 påverkar försvarsmekanismen mot enterovirus, vilket skulle kunna innebära att barn som är predisponerade för diabetes 1 löper större risk att sjukdomen bryter ut vid intag av komjölk innehållande A1- och B-varianterna av β -kasein (Elliott *et al.*, 1999).

Effekter av β -laktoglobulin polymorfism

Försök har visat att β -laktoglobulinkoncentrationen i mjölk varierar med β -laktoglobulingenotypen (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Robitaille *et al.*, 2002). När det gäller mjölk- och proteinmängd är AA den genotyp som är fördelaktigast då mjölk från kor med denna genotyp visat sig innehålla 10-20 % mer β -laktoglobulin än mjölk från kor med β -laktoglobulin BB-varianten (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984; McLean *et al.*, 1984; Robitaille *et al.*, 2002). Den högre proteinmängd som har observerats för AA-genotypen beror inte på en högre proteinprocent utan på att mer mjölk produceras av dessa mjölkkor (se sammanställning av Hill *et al.*, 1997). I en undersökning av 27 kor med olika β -laktoglobulin genotyper (AA, AB och BB) visades att kor med BB-genotypen hade högst kaseinhalt. Därefter kom AB och lägst kaseinhalt i mjölken hade AA (Schaar, 1986). Mjölksammansättningen skiljde sig även i andel kasein av totalprotein (BB>AB>AA) och fett/kasein förhållandet (AA>AB>BB).

I en studie av Hill *et al.* (1992) visades att tankmjölk som samlats in från kor med β -laktoglobulin AA-genotyp hade en sammansättning som skiljde sig väsentligt från β -laktoglobulin BB kor. β -laktoglobulin AA-mjölk hade 28 % högre vassleprotein-koncentration, 7 % lägre kaseinkoncentration, 11 % lägre fettkoncentration och 6 % lägre ts koncentration än β -laktoglobulin BB mjölk. Den högre vassleproteinhalten i β -laktoglobulin AA tankmjölk orsakas av en kraftig ökning av β -laktoglobulin koncentrationen i denna typ av mjölk, vilken inte balanseras av en lägre α -laktalbuminhalt. Hill *et al.*, (1992) föreslår att höga koncentrationer av β -laktoglobulin eller närvaron av β -laktoglobulin A-varianten dämpar syntesen av andra mjölkproteiner.

Även fettinnehållet i mjölk påverkas av β -laktoglobulin genotyp. β -laktoglobulin AB- och BB-mjölk innehöll signifikant högre fettkoncentrationer jämfört med β -laktoglobulin AA-mjölk (McLean *et al.*, 1984; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984).

Sammanfattningsvis kopplas alltså β -laktoglobulin AA-genotypen till en högre mjölkavkastning, högre total proteinhalt och större vassleinhåll medan BB-genotypen associeras med högre fett- och kaseinhalt, ts-koncentration samt ett högre kaseintal.

Olika varianters inverkan på processegenskaperna hos mjölk

Det finns ett samband mellan de olika genetiska varianterna och processegenskaperna hos mjölken. För produktutbytet spelar mängderna av de olika proteinerna roll, eftersom de

inverkar på processningen av mjölken (Allmere, 1998; Schaar, 1984; Ikonen *et al.*, 1999). Den kemiska strukturen hos de olika proteinvarianterna har betydelse för mjölkens kemiska och fysikaliska egenskaper (Allmere, 1998). Ostproduktionen har ökat under de senaste åren vilket medfört att mjölkkoaguleringssegenskaper såsom kort koaguleringsstid och ett fast koagel fått ökad ekonomisk betydelse. Mjolk med fördelaktiga koaguleringssegenskaper ger ökat ostutbyte per kg mjölk (Bynum & Olson, 1982; Erhardt *et al.*, 1996).

Kaseinets funktion är att förse kalven med protein, Ca^{2+} och fosfat. Kaseinerna är mer eller mindre hydrofoba och för att de ska kunna hållas lösta i vasslen bildas kaseinmiceller. Kaseinmicellen påverkar till stor del stabiliteten hos mjölkprodukterna under uppvärmning. Micellegenskaperna är mycket viktiga i de olika stegen i osttillverkning och de bestämmer till stor del de reologiska egenskaperna för fil- och yoghurtprodukter (Walstra & Jenness, 1984). Kaseinmicellen består av en kärna av α_s -kasein och β -kasein som är hydrofob, och ett hölje av κ -kasein som är hydrofilt. De hydrofila κ -kasein molekyllkedjorna är negativt laddade, vilket gör att kaseinmicellerna repellerar varandra (Dalglish *et al.*, 1989). För att mjölkens kaseiner ska koagulera och bilda gel tillsätts löpe (chymosin och pepsin). När detta görs klipps de hydrofila molekyllkedjorna av, vilket medför att kaseinmicellerna bildar ett sammanhängande nätverk. Gelen bryts sedan i små tärningar under omrörning, vilket leder till syneres och att vassleproteinerna och laktos kan avskiljas från ostmassan (Fox & McSweeney, 1998).

Vid industriell osttillverkning bryts den koagulerade ostmassan vid ungefär 30 minuter efter tillsättningen av löpe. Tidpunkten baseras på den tid som krävs för den genomsnittliga mjölken att koagulera (Fox & McSweeney, 1998). Fastare ostmassa vid brytningen av koaglet ökar ostutbytet genom att mindre kasein och fett förloras till vasslefasen (Bynum *et al.*, 1982). κ -kasein B-varianten ger en kortare koaguleringsstid, snabbare ostmassebildning och fastare ostmassa jämfört med A-varianten (Schaar, 1984; Ikonen *et al.*, 1997; Ikonen *et al.*, 1999; Ikonen *et al.*, 1996). Detta anses bero på att κ -kasein B allelen är kopplad till mjölk med ett högt kaseininnehåll (Ikonen *et al.*, 1997; Schaar, 1984) och högt κ -kasein innehåll (Ikonen *et al.*, 1997). κ -kasein E-varianten har visat sig ha sämre koaguleringssegenskaper jämfört med A- och B-varianten (Lodes *et al.*, 1996; Ikonen *et al.*, 1997; Ikonen *et al.*, 1999). De ofördelaktiga egenskaperna hos κ -kasein E beror eventuellt på en aminosyrasubstitution där serin bytts ut mot glycin. Hos de övriga kaseinerna fungerar aminosyran serin som en viktig länk mellan kaseinmolekylen och fosfatmolekylen och förlusten av serin hos E-varianten av κ -kasein kan eventuellt vara orsaken till de sämre koaguleringssegenskaperna. κ -kasein B bidrar även till en fördelaktig mjölkproteinsammansättning (Ikonen *et al.* 1996; Macheboeuf *et al.*, 1993; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Schaar, 1984). Genom att avla för κ -kasein B allelen eller någon allel vid ett annat locus som är kopplad till de fördelaktiga koaguleringssegenskaperna kan sannolikt ostutbytet ökas. Vid studier av koaguleringssegenskaper har β -kasein BB-genotypen visats bidra till bättre koaguleringssegenskaper än AA (Janson *et al.*, 1993; Macheboeuf *et al.*, 1993).

När det gäller β -laktoglobulin relateras BB-genotypen till en större mängd ost och ett fastare koagel, vilket antagligen beror på det högre kaseininnehållet (Jakob & Puhán, 1992). BB-genotypen är även fördelaktig vid tillverkning av fermenterade produkter och mjölkpulver eftersom B-varianten av proteinet har visats ge mindre beläggningar inuti värmeväxlaren, vilket leder till färre driftsstopp för rengöring (Hill *et al.*, 1997).

"Räkgenen" FMO3

Lukt- och smakfel på mjölk är kvalitetsfel som måste undvikas, eftersom det kan leda till att konsumtionen av mjölk minskar. För att upprätthålla en hög mjölkkonsumtion är det viktigt

att undersöka varför smakfel uppstår så att felet kan elimineras. Det finns individuella skillnader i smaken på mjölk (Lundén, 2005) och skillnader mellan olika raser har observerats (Chazal & Chilliard, 1987).

Tre olika klasser används för att klassificera mjölkens smak och denna undersökning görs med organoleptisk/sensorisk analys. Mejerierna gör avdrag på leverantörspriset för mjölk med anmärkning och kan stänga av leverantören helt vid upprepade smakfel (Lindberg *et al.*, 2004). Genom att mäta flyktiga föreningar, vilka oftast finns i låga koncentrationer i mjölken, kan mjölkaromen karaktäriseras. Om balansen mellan de flyktiga föreningarna rubbas eller en substans förekommer i förhöjd koncentration kan ett smakfel i mjölken uppstå (Walstra & Jenness, 1984). Vid en undersökning som gjordes 1999 visade det sig att ungefär 5 % av mjölkbesättningarna hade anmärkning med avseende på smaken på tankmjölken (Lindberg *et al.*, 2004). Räksmak är ett relativt nytt kvalitetsfel i mjölk, som identifierades först genom de rutinmässiga smaktesterna som görs 1-2 gånger per månad på mjölk från gårdstankarna i Sverige (Gustavsson, 2001). Miljöfaktorer såsom fodertyp, korns ålder och laktationsstadium, mjölkkningsrutiner och utrustning, hög nivå av vissa bakterier, etc., kan ge upphov till smakfel i mjölken, men det kan även bero på genetiska faktorer. Räksmak karaktäriseras av en obehaglig smak och lukt som påminner om gamla räkskal eller ruttnande fisk (Lundén *et al.*, 2002^b). Tidigare har räksmaken troligen hopblandats med andra typer av smakfel och därför är inte hela bakgrunden till detta kvalitetsfel känt.

Effekt av *FMO3*-mutationen

Flavin-containing monooxygenase 3 (*FMO3*) är ett enzym som i levern omvandlar trimetylammin (TMA) till TMA-oxid (Cashman *et al.*, 1995). *FMO3* är den gen vilken i muterad form orsakar räksmak i mjölk. Genen nedärvs autosomt recessivt. Kor med mjölk som smakar och luktar ruttnande fisk bär en mutation i *FMO3*-genen vid aminosyrarpositionen 62 i exon 6, där C-nukleotiden har bytts ut mot T i nukleotidpositionen R238 i den kodande regionen. Detta gör att arginin (R) ändras till ett stoppkodon (X) och därav benämningen *R238X*. *R238X*-substitutionen gör att gentranslationen avbryts i förtid, vilket resulterar i avsaknad av mer än 50 % av aminosyrasekvensen hos *FMO3*-enzymet (Lundén *et al.*, 2002^b).

Mutationen i *FMO3*-genen leder sannolikt till total avsaknad av FMO-enzymaktivitet (Lundén *et al.*, 2002^b). Under normala förhållanden oxideras TMA till luktfri TMA-oxid, som sedan utsöndras i urinen (Al-Waiz *et al.*, 1987). Smakfelet hos de kor som har mutationen har enligt djurägarna visat sig kvarstå oberoende av vilket foder de får (Lundén *et al.*, 2002^b). I studien av Lundén *et al.* (2002^b) var alla kor som producerade mjölk med räksmak homozygota för mutationen, samtidigt som kor utan smakfel i samtliga fall var homozygota för den normala allelen. För att man ska uppleva räksmak i mjölk krävs bara 1-2 ppm TMA (Ampuero *et al.*, 2002). TMA-innehållet i mjölken hos kor som är homozygota för mutationen (XX) har visat sig variera mellan 1 och 16 mg/kg mjölk (Lundén *et al.*, 2002^a). Enligt Lundén *et al.* (2002^b) kan heterozygota bärare av mutationen under vissa förhållanden producera mjölk med räksmak, vilket kan bero på haploinsufficiens. Haploinsufficiens innebär att en normal kopia av genen i enkel uppsättning inte är tillräcklig för att ge en normal fenotyp/funktion utan två fungerande kopior krävs.

I mjölkproverna med anmärkning på räksmak påträffades även höga mängder av TMA (Lundén *et al.*, 2002^a). Vid mejeriernas smak- och luktprovning av tankmjölk från olika gårdar har det visat sig att räksmaken kan orsakas av ett fåtal individer i en besättning (Lundén *et al.*, 2002^a). Om räksmak uppstår i den samlade tankmjölken beror på antalet kor i besättningen som bär mutationen, hur hög TMA-halten i deras mjölk är och hur stor andel

deras mjölk utgör av den totala mängden tankmjölk. Under 2001 hade 82 gårdar anmärkning på räksmak, medan antalet året efter hade minskat till 24 gårdar, enligt statistik från mjölkbedömningsdata (Lindberg *et al.*, 2004). Statistiken från år 2002 ska dock tolkas med viss försiktighet eftersom 10 % av rådatamaterialet saknades. En minskning av frekvensen av räksmak är dock troligt, delvis som en effekt av att kunskaperna om orsakerna till felet ökade under denna period (Lindberg *et al.*, 2004). De nya kunskaperna om vad som orsakar smakfelet gjorde att alla presumtiva avelstjurar idag testas med avseende på *FMO3* X-allelen redan som kalvar, något som snabbt kommer att minska problemet.

Mutationen antas ha funnits hos SRB-rasen relativt länge. När man försökte hitta en gemensam anfader till de kor som producerade mjölk med räksmak kunde inte en sådan identifieras inom de senaste tio generationerna. Sannolikt har mutationen skett någon gång i början av 1900-talet eller tidigare, att döma av de härstammingsuppgifter som samlats. Vidare tyder härstammingsuppgifterna på att *R238X*-anlaget finns i fler Ayrshirepopulationer än bara hos SRB (Lundén *et al.*, 2002^b) och sannolikt även hos Holsteinrasen (Lundén, 2005). I en undersökning av Johnson *et al.* (1973) hittades en ko av rasen US Holstein som ständigt producerade en fisklukttande mjölk med höga TMA-halter. Den genetiska orsaken till räksmaken var då inte fastställd, men det är troligt att X-allelen finns i US Holstein populationen.

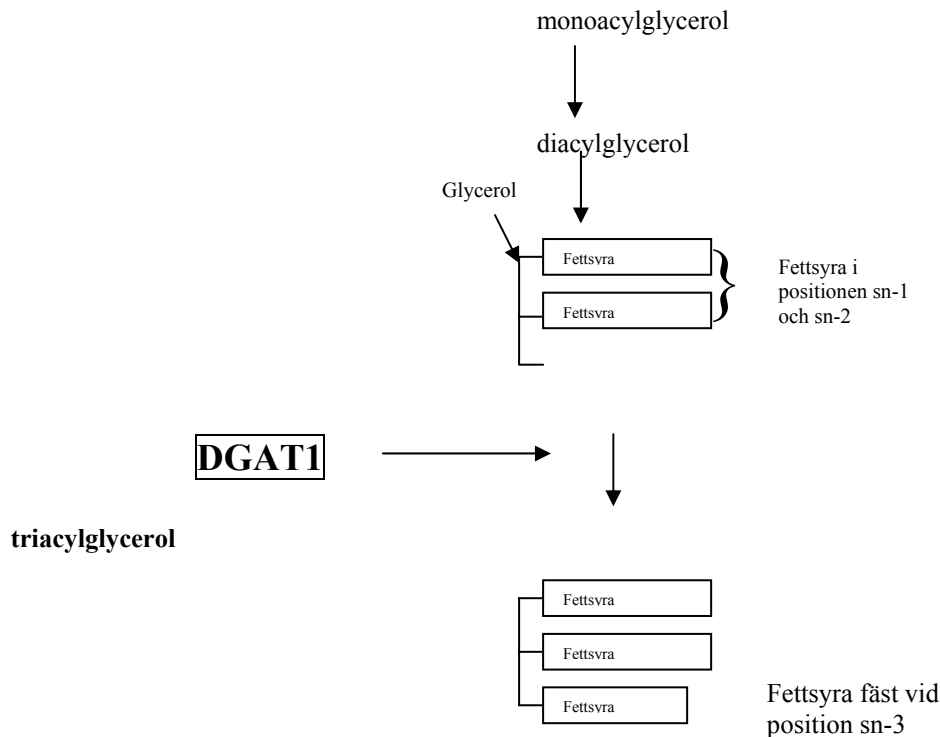
Allelfrekvenser

Lundén *et al.* (2002^b) redovisar resultat från en undersökning av 248 djur, där de fyra svenska mjölkkoraserna SRB, SLB, SKB Jersey fanns representerade. SRB-rasen var den enda där *R238X* substitutionen kunde hittas. Hos denna ras var två av hundra djur homozygota för mutationen medan 27 kor var heterozygota, vilket motsvarar en relativt hög allelfrekvens på 0,155 (Lundén *et al.*, 2002^b). Mutationen har även påträffats hos finska Ayrshiretjurar (www.svavel.se/databas/rak_tjur.asp).

"Fetthaltsgenen" *DGAT1*

Mjölkfett

Mjölkfettet påverkar utbytet vid tillverkning av mejeriprodukter, produkternas konsistens, närings- och hälsoegenskaper och mjölkens smak. Både miljö- och arftliga faktorer inverkar på mjölkens fetthalt och sammansättning. Arvbarheten för innehållet av fett i mjölk beräknas till 0,45-0,5 (Winter *et al.*, 2002). Medelfetthalten hos svenska kor av SRB-ras ligger runt 4,3 % (Larsson & Olsson, 2005). Mjölkfettet består till 98 % av triacylglycerol vilket är sammansatta av en glycerolmolekyl och tre fettsyror (se figur 2). Fettsyrorna består av kedjor av kolatomer av varierande längd (4-18). Idisslarmjölk, i jämförelse med mjölk från enkelmagade djur, innehåller kortkedjiga fettsyror, Short Chained Fatty Acids (SCFA), vilka består av 4-6 kolatomer. Hälften av mjölkfettet (framförallt de kortkedjiga fettsyrorna) syntetiseras i juvret, sk *de novo* syntes, medan den andra hälften kommer från blodlipider som härrör från foder eller kroppsfett.



Figur 2. Schematisk illustration av triacylglycerolsyntesen (sammanställning av Näslund, 2004).

***DGAT1*-genen**

För att fettsyror ska binda in till glycerolmolekylen krävs katalyserande enzymer. Enzymet diacylglycerol-acyltransferas (DGAT) inkorporerar fettsyror på sn-3 (sn=stereospecific numbering) positionen på glycerolmolekylen (Horton *et al.*, 2002; se figur2). Det är i sn-3 positionen de kortkedjiga fettsyror som är specifika för idisslarmjolk återfinns. Den gen som kodar för det ovannämnda enzymet DGAT kallas *DGAT1* (Cases *et al.*, 1998). Vid ett försök med knock-out möss slogs *DGAT1*-genen ut och man fann att laktationen därmed inhiberades (Smith *et al.*, 2000). Detta visar på genens stora betydelse för mjölkproduktionen. Identifieringen av *DGAT1* började med att man fann ett "quantitative trait locus" (QTL) med stor inverkan på mjölmängd och mjölksammansättning och då speciellt på fetthinnehållet (Grisart *et al.*, 2002). Detta QTL återfanns vid centromeren på kromosom 14 (Coppieters *et al.*, 1998; Riquet *et al.*, 1999; Farnir *et al.*, 2002). Efter upptäckten av detta QTL började sökandet efter kandidatgener. I och med att *DGAT1* hade visat sig spela en viktig roll i fettsyntesen och laktationen var det en god kandidatgen.

***DGAT1*-polymorfism**

Variationen i QTL-effekten har tillskrivits en dinukleotids substitution i exon VIII av AA till GC i *DGAT1* vilken resulterar i en aminosyrasubstitution av lysin (K) till alanin (A) i position 232, därav benämningen *K232A* (Grisart *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002). I en studie av Kühn *et al.* (2004) fann man i promoterregionen, vilken är en regulatorisk del av genen som fungerar som bindningsplats för RNA polymeras, av *DGAT1* ett "Variable Number of Tandem Repeats" (VNTR). Detta VNTR innehåller en sekvens av nukleotider, CCCGCC, som troligen binder in transkriptionsfaktor SP1. Antalet sekvensupprepningar tros vara proportionell till transkriptionshastigheten av *DGAT1*-genen och därmed mängden enzym

som produceras. Denna polymorfism i promoterregionen visade sig påverka fettprocenten signifikant även hos tjurar som var homozygota AA. Dock är effekten av denna VNTR inte alls av samma dignitet som *K232A* polymorfismen (Kühn *et al.*, 2004).

Effekt av *DGAT1*-varianter

K-allelen har visat sig vara mer effektiv när det gäller mjölkfettsyntes och denna allel gör att 1,5 gånger mer triacylglycerol bildas, jämfört med A-varianten (Grisart *et al.*, 2004) Utbytet av en lysin mot en alanin tros ha en negativ effekt på DGAT-enzymets kapacitet att binda in till diacylglycerol-molekylen (Thaller *et al.*, 2003).

Lysinvarianten (K) sammankopplas med en stor ökning av fetthalten och en något mindre ökning av proteinhalten. K-allelen påverkar däremot mjölmängden negativt. Effekten på fettmängd var minst under första laktationen, för att sedan öka under de senare laktationerna (Thaller *et al.*, 2003). I studien av Thaller *et al.* (2003) på Fleckvieh och tysk Holstein visades att den genetiska polymorfismen *K232A* hade signifikant effekt på fettmängd, proteinmängd, fetthalt och proteinhalt över alla laktationer, med undantaget att i Fleckviehrasen fann man ingen signifikant effekt av *K232A* på proteinmängden i andra och tredje laktationen.

DGAT1's effekt på fetthalten har i en studie av Spelman *et al.* (2002) visats variera något mellan raser. Hos NZ Holstein-Friesian är effekten av K-allelen dubbelt så stor som hos Jersey. Detta tros bero på effekterna av bakgrundsgenerna, där Jerseyrasen avlats hårt mot hög mjölkfetthalt och därför sannolikt har en annan genuppsättning än Holstein. Även om inga andra "fetthaltsgener" ännu identifierats är *DGAT1* med största sannolikhet inte den enda genen som påverkar bildandet av triacylglycerol (Spelman *et al.*, 2002).

DGAT1-genen kan bli föremål för selektion för att kunna ändra mjölksammansättningen i en riktning som tillfredställer efterfrågan hos kunderna (Grisart *et al.*, 2002). I Nya Zeeland är redan *DGAT1 K232A* polymorfismen inkluderad i avelsprogrammet. De avlar för K-allelen eftersom hög fett- och proteinhalt premieras i deras betalningssystem. Genotyptestet som görs kallas "Optimum" och har patenterats av det nya zeeländska bioteknikföretaget ViaLactia Biosciences (www. ViaLactia).

Framtida studier kommer att klargöra om polymorfin i *DGAT1 K232A* inte bara påverkar fettinnehållet utan även fettsammansättningen och likaså om polymorfin kan bidra till utvecklandet av smakfel i mjölken. Små skillnader i fettets sammansättning kan förändra hur vi uppfattar mjölkens smak (Walstra & Jenness, 1984). Om det finns en koppling mellan smakfel och genotyp kan det i framtiden vara ett argument för att genotypa avelsdjuren (Näslund, 2004).

Allelfrekvenser

I en studie av Grisart *et al.* (2002) undersöktes allelfrekvenserna hos en holländsk och en nya zeeländsk population med avseende på *DGAT1*. Positiva ekonomiska vikter har under olika perioder lagts på antingen torrsubstans eller mjölkvolym, vilket sannolikt bidrar till att båda allelerna fortfarande återfinns i de holländska och nya zeeländska populationerna. I en studie av Winter *et al.* (2002) visade det sig att K-allelen är vanligare hos djur med höga avelsvärden för mjölkfetthalt.

I en undersökning på två olika mjölkkoraser (833 Fleckviehtjurar och 858 tyska Holsteintjurar) i Tyskland visades att förekomsten av olika *DGAT1*-genotyper skilde mellan raserna. Den skattade frekvensen för K-allelen i Fleckviehrasen var 0,072 och för tysk

Holstein 0,55 (Thaller *et al.*, 2003). Studien av Winter *et al.* (2002) uppskattar allelfrekvensen hos Fleckvieh till 0,07 för K-allelen vilket stämmer överens med undersökningen av Thaller *et al.* (2003). Allelfrekvenser för *DGATI* hos Holstein har rapporterats från olika källor. Hos den nyzeeländska populationen var frekvensen för K-allelen 0,30 och hos den holländska var den 0,63 (Grisart *et al.* 2002). I två olika studier av tyska Holstein skattades allelfrekvensen till 0,35 respektive 0,44 (Winter *et al.* 2002; Thaller *et al.* 2003). Att döma av Kaupe *et al.* (2004) tycks köttraser ha en högre frekvens av A-allelen, medan mjölkkraserna visade en större variation i frekvensen av A-alleler.

Näslund *et al.* (2004) genomförde en studie på SLUs försöksbesättning vid Jälla. I försöksbesättningen finns mjölkkor av raserna SRB, SLB samt några Jerseykor. SRB korna ingår i en selektionsstudie och är selekterade i en lågfettslinje (LF) respektive en högfettslinje (HF) avseende mjölkfett, men samma totala energiinnehåll i mjölken. Totalt 279 kor från försöksbesättningen genotypbestämdes för *DGATI K232A*. Antalet kor av de olika raserna var 171 SRB kor, varav 76 kor från HF linjen och 91 kor från LF linjen, 102 av Svensk Holsteinras och 6 Jerseykor. Undersökningen visar att K-allelen var något vanligare hos SLB (0,13) än hos SRB (0,09) och av de 6 Jersey korna var 5 homozygota för K-allelen och en heterozygot för K-allelen (0,92).

EGEN UNDERSÖKNING

Material och metoder

Djurmaterial

I denna studie undersöktes 65 rödkulletjuror. DNA preparerades från sperma lagrad i payetter, pelleter eller blod som kommer från Svensk Avel och Jordbruksverkets genbank. Tjurarna är födda mellan 1961-2003. Bilaga 4 ger en schematisk illustration av rödkulletjurornas inbördes släktskap (Rödkulletjuror i semin och privat genom åren; Rödkullan, 2005).

Genotypbestämningen gjordes för de vanligaste förekommande varianterna av κ -kasein (A, B och E), β -kasein (A1, A2, A3 och B), β -laktoglobulin (A och B), *FMO3* (R och X) och *DGATI* (A och K) locus. Vid genotypbestämningen analyserades så kallade "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) som används för att kunna skilja ut variation i enstaka nukleotider. SNPs används som genetiska markörer och de blir allt vanligare när det gäller genotypbestämning för enskilda gener med möjlig eller påvisad effekt på ekonomiskt viktiga egenskaper i husdjursaveln.

DNA preparering

DNA-preparering från blod:

Genomiskt DNA preparerades från blodprover enligt följande. Helblod som förvarats fryst i 80°C tinades varav 100 μ l tillsattes i ett eppendorfrör. 1 ml av buffert A (se bilaga 5) tillsattes och provet centrifugerades i 13 000 rpm under 1 min varefter supernatanten avlägsnades. Proceduren upprepades tills de röda blodkropparna hade avlägsnats. Därefter tillsattes 100 μ l av buffert D som blandats med enzymet proteinas K (8 μ l proteinas K per ml av buffert D; se bilaga 6) varefter provet inkuberades i en timme i 56°C. Slutligen sattes provet på ett 95°C värmeblock i 10 min för att inaktivera enzymet.

DNA-preparering från sperma:

Till 20 µl sperma tillsattes 1 ml 5 % Triton X-100. Provet centrifugerades därefter i 13 000 rpm under 30 sek varefter supernatanten avlägsnades. Pelleten resuspenderades sedan i 50 µl 0,01 M Tris (pH 7.8) och 3 µl 1M dithiotreitol. Provet blandades och 2.5 µl pronase E tillsattes. Efter detta fick provet stå i värmeblock i 65°C i 60 minuter, för att sedan inaktiveras i 99°C värmeblock i 5 minuter. Slutligen vortexades provet varefter 0.5 ml ddH₂O tillsattes.

DNA-preparering från pellet:

Pelletterna löstes upp i 50 µl Triton X-100, därefter preparerades proven på samma sätt som för sperman.

PCR

PCR-primrar:

För att köra en PCR-reaktion måste primrar designas som är komplementära till de sekvenser på DNAt som angränsar till mutationen. För varje primer användes en primer inmärkt med biotin som band till den komplementära DNA-strängen. PCR-produkten består sedan av ett stort antal kopior av fragmentet med den mutation vi vill analysera. Detta görs för att få tillräckligt med utgångsmaterial som sedan används vid sekvenseringen. Bilaga 7 visar de PCR-primrar som användes, här anges även vilken position det amplifierade fragmentet har i gensekvensen och dess längd. De primers som användes för att genotypa tjurarna för κ-kasein, β-kasein, β-laktoglobulin och *FMO3* har tidigare designats på institutionen för husdjursgenetik.

PCR-mix:

För att kunna bestämma DNA-sekvensen för ett genfragment måste man först uppföröka (amplifiera) mängden kopior av det aktuella fragmentet, vilket sker med hjälp av en PCR-reaktion.

PCR-reaktionen utfördes i instrumentet PTC-200 DNA Engine, i en reaktionsvolym av 20 µl för kaseinerna och β-laktoglobulin och där HotStarTaq PCR kit användes (se bilaga 8). För *DGATI* och *FMO3* användes en reaktionsvolym av 25 µl resp. 20 µl och till dessa reaktioner användes AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) PCR kit (se bilaga 9).

PCR-program:

PCR-reaktionerna startas upp med ett första steg under vilket enzymet aktiveras. Proverna upphettas vid detta steg till 94-95°C. Därefter denatureras allt DNA, vilket betyder att DNA-strängarna separeras och blir enkelsträngat. Sedan kommer ett steg där temperaturen sänks så att primrarna kan fästa vid det DNA-fragment man vill amplifiera. Denna temperatur är optimerad för vart och ett av de primerpar som används. Därefter höjs temperaturen igen så att enzymet (Taq polymeras) kan syntetisera fragmentet. Denna procedur upprepas tills erforderlig mängd av de olika DNA-fragmenten erhållits. Till sist sänks temperaturen till 4°C.

Testgel:

För att fastställa att PCR-körningen fungerat prövades en del av proverna på agarosgel. För agarosgelen användes följande recept:

1,5 g NuSieve
0,5 g SeaKem
50 ml 0,5xTBE.

En storleksmarkör inkluderades för att fastställa att rätt fragment amplifierats. Testgelen visade att det fanns PCR-produkt i proverna samtidigt som ingen PCR-produkt fanns i de negativa kontrollerna. Gelen färgades med etidumbromid och lästes av under UV-ljus.

Sekvensprimrar:

Bilaga 10 visar vilka primrar som användes vid sekvenseringen, deras position i genen samt deras respektive DNA-sekvenser.

Identifiering av genotyp - pyrosequencing

För analys med pyrosequencing immobiliserades först den biotinylerade PCR-produkten på streptavidin-belagda kulor (Dynal AS, Oslo) med hjälp av en buffert innehållande 5 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05% Tween 20 vid pH 7.6. Vid optimering av detta steg bestämdes att 25 µl PCR-produkt var optimal volym för *DGAT1* medan för *FMO3* och β-laktoglobulin var 20 µl optimalt, medan motsvarande volym för kaseinerna var 10 µl. Enkelsträngat (ss)DNA erhöles genom tvätt med 0.5 M NaOH i en minut och tvätt av kulorna i 10 mM Tris-Acetat.

I nästa steg fick totalt 15 pmol av sekvenserings-primern, designad med sin 3' ända direkt uppströms om polymorfin, hybridisera till ssDNA i en buffert innehållande 20 mM Tris-Acetat, 5 mM MgAc₂ vid pH 7.6 under 2 min vid 80°C. Sekvensprimrarna hybridiserar till det enkelsträngade DNA-fragmentet som erhållits via PCR och denaturering (Ronaghi *et al.*, 1998). Pyrosequencing utfördes sedan i ett PSQ96-instrument med användande av SNP Reagent kit innehållande dATP, dCTP, dGTP, dTTP, enzym-blandning (DNA polymeras, ATP sulfurylas, luciferas, och apyras) och substrat-blandning (APS och luciferin; Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). För att en nukleotid ska inkorporeras i det stegvis syntetiserade DNA-fragmentet måste nukleotiden vara komplementär till basen i templatsträngen. Deoxynukleotider som inte matchar, och därmed inte inkorporeras, och det ATP som produceras degraderas mellan varje cykel av nukleotiddegraderande enzym (Ronaghi *et al.*, 1998).

Inkorporering av nukleotider genererar via enzymen sulfurylas och apyras ljus som detekteras av en laserstråle i instrumentet. Detta genererar toppar i det så kallade pyrogrammet och förloppet kan följas på skärmen kopplad till instrumentet. Resultaten från analysen uttrycks som kvoten mellan signalstyrkorna från de inkorporerade nukleotiderna.

χ^2 -test

De observerade genotypfrekvenserna jämfördes med de som man kan förvänta, utifrån de framräknade allelfrekvenserna med ett χ^2 -test. Om man har ett locus med två alleler, A och a, med frekvenserna p och q kan man med ett enkelt samband beräkna hur dessa alleler fördelar sig i en population med avseende på de tre möjliga genotyperna AA, Aa och aa. Sambandet skrivs ofta som:

$$p + q = 1 \rightarrow p^2 + 2pq + q^2$$

där p = frekvensen av A-allelen, och q = frekvensen av a-allelen. Detta samband förutsätter dock att populationen ifråga är i Hardy-Weinberg jämvikt, vilket är fallet om de genotypbestämda djuren härör från en stor population med slumpmässig parning och där allelfrekvenserna är samma bland både handjur och hondjur och där ingen selektion, mutation eller migration skett inom populationen. En population i Hardy-Weinberg jämvikt kännetecknas av relativt konstanta allel- och genotypfrekvenser över generationer.

Resultat

Genotypfrekvenser

I Tabell 3 redovisas de observerade genotypfrekvenserna bland de 65 avelstjurarna av rödkulleras. Resultaten visar att rödkullorna bär på de för mjölk kvaliteten ofördelaktiga allelerna κ -kasein E och *FMO3* X. Enligt resultaten från χ^2 -analysen var genotypfrekvenserna för κ -kasein AA- och BE-genotyperna något vanligare än förväntat, baserat på allelfrekvenserna i materialet. Även β -kasein A2A2-genotypen var något vanligare än förväntat, medan A1B och A2B-genotyperna i samma locus var något ovanligare. Vad beträffar β -laktoglobulin, *FMO3* och *DGATI* påvisade χ^2 -analysen dock ej någon signifikant skillnad mellan de förväntade värdena och de observerade.

Tabell 3. Observerade och förväntade genotypfrekvenser i gener med effekter på mjölk kvaliteten, analys av 65 tjurar av rödkulleras.

Locus	Genotyp	Antal djur	Observerad genotypfrekvens	Förväntad genotypfrekvens
β -kasein	A1A1	12	0,19	0,19
	A2A2	19	0,29	0,28
	A1A2	30	0,46	0,46
	A1B	1	0,015	0,033
	A2B	2	0,031	0,041
	BB	1	0,015	0,015
κ -kasein	AA	22	0,34	0,27
	BB	7	0,11	0,14
	AB	23	0,35	0,40
	AE	1	0,015	0,11
	BE	12	0,19	0,076
	EE	0	0	0,01
β -laktoglobulin	AA	4	0,062	0,040
	BB	43	0,66	0,64
	AB	18	0,28	0,32
<i>FMO3</i>	RR	57	0,88	0,88
	RX	8	0,12	0,12
	XX	0	0	0,0038
<i>DGATI</i>	AA	57	0,88	0,81
	AK	7	0,11	0,12
	KK	1	0,015	0,06

Allelfrekvenser

Tabell 4 visar allelfrekvenserna för de tre undersökta mjölkproteingenerna (β -kasein, κ -kasein och β -laktoglobulin) samt för de två övriga generna med betydande effekt på mjölk kvaliteten, *DGATI* och *FMO3*.

Tabell 4. Allelfrekvenser i gener med effekter på mjölk kvaliteten, analys av 65 tjurar av rödkulleras.

Locus	Allel	Frekvens
β-kasein	A1	0,43
	A2	0,53
	B	0,04
κ-kasein	A	0,52
	B	0,38
	E	0,10
β-laktoglobulin	A	0,20
	B	0,80
FMO3	R	0,94
	X	0,06
DGATI	A	0,93
	K	0,07

Diskussion

χ^2 -test

Resultaten som framkom av χ^2 -testet visade att för två locus avvek de observerade genotypfrekvenserna från de som kunde förväntas om populationen befunnit sig i Hardy-Weinberg jämvikt. Detta kan ha en rad orsaker: Den undersökta gruppen av rödkullor är liten och hör dessutom från en ras som numerärt sett är liten. I en sådan population är risken för genetisk drift större, dvs. slumpen har större effekt på nästa generations allelfrekvenser, än i en stor population. Det är dessutom tveksamt om de genotypade tjurarna kan anses utgöra ett slumpmässigt urval av populationen, dvs om den nära släktskapen mellan de tjurar som finns med i undersökningen är representativ för populationen som helhet. Andra kriterier som måste vara uppfyllda för att Hardy-Weinberg jämvikt ska råda är att det inte får förekomma någon selektion för eller emot genen i fråga. I rödkullepopulationen har inte någon selektion mot någon av de gener som ingått i undersökningen gjorts medvetet eftersom djurens genotyp inte varit känd, men urval för yttre egenskaper såsom färg kan innebära en indirekt selektion, om genen för färgen ifråga ligger nära någon av mjölk kvalitetsgenerna. Migrationen, dvs utbyte av djurmaterial mellan populationer, ska dessutom vara obefintlig eller mycket liten för att populationen ska befinna sig i Hardy-Weinberg jämvikt, något som dock uppenbarligen skett mellan rödkullor från olika nordiska länderna.

Rödkullornas mjölk kvalitet och allelfrekvenser

κ-kasein

κ-kasein E-allelen är, som tidigare nämnts, vanligt förekommande hos SRB-rasen och US Holstein medan den sällan iaktas hos lantraser (Lien *et al.*, 1999), vilka kännetecknas av en mindre intensiv selektion för mjölkavkastning än den som bedrivs i ”moderna” raser som SRB och SLB. Förekomsten av denna allel hos rödkullan visar dock att även andra faktorer än avelsurval för hög mjölkproduktion påverkar frekvensen av denna allel. Lien *et al.* (1999) rapporterade en allelfrekvens för E-varianten hos rödkullor på 0,20 medan frekvensen bland tjurarna i denna studie var 0,10. E-varianten i detta djurmaterial kan spåras tillbaka till den svenska stamfadern Linus, som var bärare av denna allel. Föreliggande undersökning påvisar en högre frekvens av A-varianten än tidigare studier av rödkulla, Svensk kullig boskap och Svensk fjällras (Lien *et al.*, 1999). Frekvensen av A-allelen är dock lägre än hos SRB och

SLB där frekvensen rapporterats ligga mellan 0,70-0,85 (Janson *et al.*, 1993; Lundén *et al.*, 1997; Lien *et al.*, 1999). Frekvensen för B-allelen ligger i denna undersökning på 0,38, dvs något lägre än i tidigare undersökning av Lien *et al.* (1999) vilken redovisade en frekvens på 0,46. B-allelen betraktas som fördelaktig eftersom den ger en högre kaseinmängd, högre κ -kaseinmängd och en mindre kaseinmicell (Ikonen *et al.*, 1999), faktorer som är kopplade till fördelaktiga osttillverkningsegenskaper. SLB och SRB har relativt låga frekvenser av B-allelen, medan fjällkorna är den ras som hade den högsta frekvensen av B-allelen (0,71 resp. 0,62; Lien *et al.* 1999; Janson *et al.*, 1993). Hos fjällrasen har E-allelen ännu inte påträffats.

β-kasein

Av β -kasein allelerna var A2 den vanligaste hos de undersökta tjurarna, men även A1 är frekvent i populationen. När det gäller β -kasein föredras A2-allelen eftersom den är associerad med en högre mjölkavkastning än A1-allelen (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984) samtidigt som A1- och B-varianterna tros kunna bidra till utvecklandet av diabetes typ 1 (Elliott *et al.*, 1999). Rödkulletjurarna i denna studie hade en något högre allelfrekvens av β -kasein A2 än rödkullorna i studien av Lien *et al.* (1999). De populationer som undersökts av Lien *et al.* (1999), Lundén *et al.* (1997) och Janson *et al.* (1993) uppvisar liknande allelfrekvenser för β -kasein som i denna studie.

β-laktoglobulin

Allelfrekvenserna för β -laktoglobulin i denna studie överensstämmer med de i studien av Lien *et al.* (1999). Rödkullorna har en hög frekvens av B-allelen, vilket ses som fördelaktigt eftersom BB-genotypen har visats vid osttillverkning ge en större mängd ost och ett fastare koagel. B-allelen har även positiv effekt på fermenterade produkter (Hill *et al.*, 1997) och mjölkpulverframställningen (Hill *et al.*, 1997). Hos de övriga svenska raserna är B-allelen något mindre vanlig.

FMO3

Studien visar att åtta tjurar bär på *FMO3* X-allelen, om än i heterozygot form (se Tabell 3). Detta motsvarar en frekvens för X-allelen på 0,10, vilket är en förhållandevis hög frekvens och närmast jämförbar med frekvensen av motsvarande allel hos SRB (0,16) som är den hittills enda av de svenska raserna där denna variant påträffats (Lundén *et al.*, 2002). Eftersom mjölken från kor som är homozygota för *FMO3* X-anlaget producerar mjölk med smakfel är det angeläget att detta anlag på sikt rensas bort ur rasen.

DGATI

De flesta rödkulletjurarna i studien var homozygota för *DGATI* A-allelen. Denna allel är associerad med en mindre mängd fett såväl som lägre fetthalt, men har sannolikt favoriserats indirekt i många mjölkpopulationer eftersom den ger en högre mjölkavkastning och högre proteinmängd. Bara en tjur (523 Brutus) var homozygot för K-allelen. Eftersom rödkullorna är utrotningshotade har målet främst varit att hålla djurantalet uppe. Följaktligen har inte avel skett för någon specifik egenskap, så möjligen har A-allelen blivit den vanligaste i denna population på grund av "foundereffekter", dvs. att de djur som utgör grundpopulationen råkat vara bärare av A-allelen. Detta antagande stöds av att en av de fem "stamfäderna" för rasen, 13 Linus, var homozygot AA. χ^2 -analysen påvisade dock ej någon signifikant skillnad mellan de förväntade värdena och de observerade.

Hos de flesta nötkreatursraser inom släktet Bos Taurus är *DGATI* A-allelen vanligare än K-allelen. Detta beror troligtvis på att man redan tidigt under domesticeringen började selektera för hög mjölkavkastning, vilket indirekt gjort att man avlat för A-allelen. Dock finns en del

raser, exempelvis Jersey, där K-allelen är vanligare vilket troligen beror på en konsekvent driven selektion för hög mjölkfetthalt (Kaupe *et al.*, 2004). Inom Fleckviehrasen har frekvensen av K-allelen uppskattats till 0,07, vilket liknar resultaten som framkommit i denna studie. Hos SRB och SLB är A-allelen den vanligast förekommande varianten (Näslund *et al.*, 2004) och K-allelen återfanns i högre frekvens hos SLB-djuren än hos SRB. Intressant att notera i sammanhanget är att kött-raser tycks ha en högre frekvens av A-allelen än mjölk-raser (Kaupe *et al.*, 2004).

Spridning av κ -kasein E-allelen och *FMO3* X-allelen

Vid undersökningen visades att 13 Linus var bärare av κ -kasein E-allelen. Linus har troligen spridit denna allel till flera av sina avkommor. Bilaga 12 visar κ -kasein E-allelens spridning hos de undersökta rödkullorna.

FMO3 X-allelen, som hittills endast påträffats inom SRB-rasen, visade sig även finnas i rödkullepopulationen. Bland annat 509 Olle var bärare av denna allel och har sannolikt nedärvt den till sin son 505 Kronblom som i sin tur spridit den vidare till några av de undersökta tjurarna i studien. Bilaga 13 visar X-allelens spridning hos de analyserade tjurarna. Troligen bär 504 Ludde på X-allelen, eftersom tre av hans söner, 503 Rulle, 528 Primus och 523 Brutus, är bärare av allelen. Den inkorsning av SRB som skedde under början av 60-talet kan möjligen vara orsaken till att såväl "räkgenen" som κ -kasein E finns hos rödkullorna.

E-allelen tros ha spridits i SRB-populationen genom en flitigt använd finsk tjur 26350 Mäkimattilan Inssi (Velmala *et al.*, 1995). Denna tjur användes mycket under 60- och 70-talen i Sverige och hans gener kan eventuellt även ha spridits till rödkullepopulationen genom inkorsning av SRB. Stamfadern 13 Linus kan dock inte ha ärvt sin E-allel från den finska tjuren, eftersom Linus har tre rena rödkullegenerationer bakom sig, samtidigt som Mäkimattilan Inssi bara är ett år äldre än Linus. E-allelen har troligen uppkommit tidigare i rödkullepopulationen. Av de rödkulletjurarna som bär κ -kasein E-allelen var de flesta svenska rödkullor (9 av 13). Tre av tjurarna som var heterozygota för E-allelen var av svensk/östrnorsk typ och en var västrnorsk rödkulla. Sju av åtta tjurarna som bär "räkgenen" är helsvenska rödkullor. Den åttonde är en korsning mellan svensk/östrnorsk/västrnorsk rödkulla.

Tjurar med önskvärd genotyp

De alleler som föredras i de undersökta generna är hos β -kasein A2, hos κ -kasein B, hos β -laktoglobulin B och hos *FMO3* R. Vilken allel som man helst vill ha i *DGATI*-genen är inte lika självklart, de två allelerna har ungefär lika stor ekonomisk vikt idag. Bilaga 14 visar samtliga resultat från genotypbestämningen. Resultatet visar att 511 Bale och 811 Toftsbyn bär på de ur mjölk-kvalitetssynpunkt fördelaktigaste genotyperna i samtliga loci. 507 Jadargut, 538 Ceasar, 586 Enok och 750 Fritz bär också de önskvärda genotyperna i flertalet loci. Om man bara ser till mjölk-kvalitetsegenskaperna borde dessa tjurarna användas mer i aveln. 507 Jadargut, 538 Ceasar och 586 Enok utgör tre av de totalt fem östrnorska rödkullorna i undersökningen vilket indikerar att de i Sverige använda östrnorska rödkullorna har bidragit till förbättrade mjölk-kvalitetsegenskaper. En tjur med mindre gynnsam mjölk-kvalitetsgenotyp är 709 Stensjö som är bärare av både κ -kasein E-allelen och X-allelen i *FMO3*-locuset.

Framtida avel

I det framtida avelsurvalet bör man se upp med "räkgenen" för att inte riskera att den blir alltför spridd. Rödkullepopulationen är så pass liten att genfrekvenser kan driva iväg åt ett håll av ren slump, sk genetisk drift. Därför bör man överväga att genotypbestämma alla tjurarna som

ska användas i aveln för ”räkgenen”, på samma sätt som görs inom SRB-rasen. Tjurar som är heterozygota för X-allelen bör användas i aveln om de representerar ovanliga härstamningar för att inte minska avelsbasen, men man bör då välja den hälften av sönerna som inte ärvt X-allelen från fadern.

κ -kasein E-varianten har inte en lika drastisk effekt på mjölk kvaliteten som ”räkgenen”. Här är det mer frågan om att väga vinsten mot kostnaden, men om rasen ska bli mer kommersiellt gångbar genom förbättrade ystningsegenskaper bör man bevaka frekvensen av κ -kasein E bland avelstjurarna.

Det tycks främst vara den svenska populationen av rödkullor som bär på *FMO3* X och κ -kasein E allelerna. Den östnorska rödkullan, å andra sidan, verkar bära på många fördelaktiga mjölk kvalitetsalleler, man har hos dessa varken lyckats påvisa ”räkgenen” eller κ -kasein E-allelen och de kan åtminstone ur denna aspekt med fördel användas i aveln. Användning av östnorska tjurar skulle dessutom utgöra ett alternativ om man inte vill genotypbestämma avelsdjuren.

Det man även bör tänka på i en liten population är att hålla den effektiva populationsstorleken så stor som möjligt. Idealt sett ska samma antal hondjur och handjur användas i aveln och varje individ ska dessutom ha samma antal avkommor i nästa generation. Detta uppnås bland annat genom att använda så många djur i aveln som möjligt, helst obesläktade, och genom att undvika att intensivanvända vissa tjurar. Man bör även undvika att selektera för relativt ovidkommande egenskaper som vissa färgnyanser och utbredningen av vita tecken. För att upprätthålla en tillfredsställande genetisk variation är det en fördel att hålla stamboken öppen för närbesläktade raser såsom den östnorska rödkullan (se figur 1).

Varför bör rödkullorna bevaras för framtiden?

Rödkullorna kan vara bärare av genvarianter som är intressanta för framtiden. Dessa djur är anpassade till en foderstat som till stor del baseras på betesdrift under svenska förhållanden. Om konsumenternas efterfrågan på ekologiska produkter ökar, vilka tas fram på en foderstat med förhållandevis hög andel grovfoder, kan rödkullorna komma att få en mer framträdande roll. Rasen representerar därtill ett kulturarv, en vandrande historiebok som minner oss om en svunnen tid.

ABSTRACT

The Swedish Red Polled breed is threatened by extinction and there are only around 1100 animals left. The breed was popular in the early twentieth century, but since then the numbers have steadily decreased. The overall objective of this study was to find out whether there may be economic incentives for preserving the breed. The milk quality properties are of major importance in the production of dairy products. Therefore we would like to establish if the Swedish Red Polled breed carries favourable alleles at loci of relevance for milk quality, to potentially make the breed more interesting for milk production.

The genetic variation in three milk protein genes, β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin, and two other milk quality genes, *DGATI* and *FMO3* were studied in 65 breeding bulls of the Swedish Red Polled breed. The bulls were genotyped using single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis and pyrosequencing. The results showed that β -casein A2, κ -casein A, β -lactoglobulin B, *FMO3* R and *DGATI* A were the most common variants at the respective locus in the Red Polled population. However, some bulls were carriers of the unfavourable κ -casein E allele whereas others were carrying the “shrimp” gene, which in homozygous form results in milk with a fishy taste. The “shrimp” gene had so far only been found in the SRB population and it is possible that one or several SRB bulls have transmitted the mutation to the Swedish Red Polled breed. As regards κ -casein, the B variant is preferred for cheese making because of its good renneting properties, while the E variant seems to be associated with poor renneting properties.

The bulls were predominantly carrying the most favourable allele at the β -casein locus (A2) whereas the A1 and B alleles have been suspected of being involved in the disease outbreak of diabetes type 1 in individuals predisposed for the disease. Also at the β -lactoglobulin locus the bulls carried the preferred allele, B, which is associated with good processing properties. As regards the *DGATI* gene, the A variant is associated with higher yields of milk and protein but lower concentrations of fat to some extent also protein. Thus, which allele is the most favourable should differ between countries.

REFERENSER

- Allmere, T. 1998.** Influence of milk protein polymorphism on acidified milk gels - protein interactions and rheology. Doktorsavhandling. Sveriges Lantbruksuniversitet, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria 119.
- Al-Waiz, M., Mitchell, S.C., Idle, J.R. & Smith, R.L. 1987.** The metabolism of ¹⁴C-labelled trimethylamine and its N-oxide in man. *Xenobiotica* 17:551-558.
- Ampuero, S., Zesiger, T., Lundén, A., Gustafsson, V. & Bosset, J.O. 2002.** Determination of trimethylamine in milk using an MS based electronic nose. *European Food Research and Technology* 214:163-167.
- Aschaffenburg, R & Drewry, J. 1957.** Genetics of the beta-lactoglobulins of cow's milk. *Nature* 180:376-378.
- Aschaffenburg, R. 1961.** Inherited casein variants in cow's milk. *Nature* 192:431-432.
- Bovenhuis, H., Van Arendonk, J. & Korver, S. 1992.** Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *Journal of Dairy Science* 75: 2549-2559.
- Brenneman, R.A., Davis, S.K., Sanders, J.O., Burns, B.M., Wheeler, T.C., Turner, J.W. & Taylor, J.F. 1996.** The polled locus maps to BTA1 in a *Bos indicus* x *Bos taurus* cross. *Journal of Heredity* 87:156-161.
- Bynum, D.G. & Olson, N.F. 1982.** Influence of curd firmness at cutting on cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *Journal of Dairy Science* 65:2281-2290.
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusi, A.J., Erickson, S.K. & Farese, Jr. R.V. 1998.** Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95:13018-13023.
- Cashman, J.R. 1995.** Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chemical Research in Toxicology* 2:165-181.
- Chazal, M.P. & Chilliard, Y. 1987.** Effect of breed of cow (Friesian and Montbéliarde) on spontaneous and induced lipolysis in milk. *Journal of Dairy Research* 54:7-11.
- Coppieters, W., Kvasz, A., Farnir, F., Arranz, J., Grisart, B., Mackinnon, M. & Georges, M. 1998.** A rank-based nonparametric method for mapping quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: application to milk production in a granddaughter design. *Genetics* 149:1547-1555.
- Dalgleish, D.G., Horne, D.S & Law, A.J.R. 1989.** Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta* 991:383-387.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernström, C.A., Farell, H.M., Harwalkar, V.R., Jeness, R & McL. Whitney, R. 1984.** Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67:1599.
- Elliott, R.B., Harris, D.P., Hill, J.P., Bibby, N.J., Wasmuth, H.E. 1999.** Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42:292-296.
- Erhardt, G. 1996.** Detection of a new kappa-casein variant in milk of Pinzgauer cattle. *Animal Genetics* 27:105-107.
- Farnir, F., Grisart, B., Coppieters, W., Riquet, J., Berzi, P., Cambisano, N., Karim, L., Mni, S., Moiso, P., Simon, P., Wagenaar, D., Vilkki, J., Georges, M. 2002.** Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics* 161:275-287.

- Felenczak, A., Ormian, M & Szarek, J. 1983.** Interrelationship between milk protein content and occurrence of genetically determined protein fractions. *Genetica Polonica* 24:355-361.
- Formaggioni, P., Summer, A., Malacarne, M. & Mariani, P. 1999.** Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus. *Annali-della-Facolta-di-Medicina-Veterinaria,-Parma.* 19: 127-165.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. 1998.** Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science, London.
- af Forselles, J. & Lundén, A. 2001.** Förekomst av kappa-kasein E genen hos dagens och morgondagens SRB-tjurar – ett hot mot ostutbytet. Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik. Examensarbete 223.
- Georges, M., Drinkwater, R., King, T., Mishra, A., Moore, S.S., Nielsen, D., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Womack, J.E. & Hetzel, D.J.S. 1993.** Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*. *Nature Genetics* 4: 206-210.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M. & Snell, R. 2002.** Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12: 222-231.
- Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, N., Kim, J., Kvasz, A., Mni, M., Simon, P., Frère, M., Coppieters, W., Georges, M. 2004.** Genetical and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1018: 2398-2403.
- Gustafsson, S & Thorén, P. 2002.** Svenska lantraser kulturarv och genresurs. Om raserna, föreningarna och bevarandearbetet. CBM:s skriftserie 6, Centrum för biologisk mångfald, Uppsala.
- Gustafsson, V., Andersson, L., Lundén, A. & Lindersson, M. 1998.** Studier av polymorfism i β -laktoglobulingenen och dess betydelse för ostutbytet hos nötkreatur. Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik, examensarbete 194.
- Gustavsson, V. 2001.** Genetic aspects on milk quality. Licentiatavhandling. Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik, Rapport 139.
- Hallander, H. 1994.** Svenska Lantraser. Blå Ankan AB, Veberöd.
- Hedling, K-G. 1987.** Fägata; husdjuren som levande kulturminnen. Rödkullan lever tack vare kämpande entusiaster. *Bygd & Natur. Årsbok 1987.* s 50-56.
- Hill, J.P. 1993.** The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 76:281-286.
- Hill, J.P., Thresher, W.C., Boland, M.J., Creamer, L.K., Anema, S.G., Manderson, G., Otter, D.E., Paterson, G.R., Lowe, R., Burr, R.G., Motion, R.L., Winkelman, A., Wickham, B. 1997.** The polymorphism of the milk protein β -lactoglobulin. A review. In "Milk Composition, Production and Biotechnology", Eds. Welch R.A.S. et al., CAB International, Wallingford, UK, 173-213.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.L., Scrimgeour, K.G. 2002.** Principles of Biochemistry, Third Edition. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall, cop.
- 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. *Animal Genetics* 27:179-181.
- Ikonen, T., Ojala, M. & Syväoja, E-L. 1997.** Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agriculture and Food Science in Finland.* 6:283-294.

- 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. *Journal of Dairy Science* 82:205-214.
- Ikonen, T., Bovenhuis, H., Ojala, M., Ruottinen, O. & Georges, M. 2001.** Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *Journal of Dairy Science* 84:507-514.
- Jakob, E. & Puhon, Z. 1992.** Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk protein –a review. *International Dairy Journal* 2:157-178.
- Janson, L., Lundén, A., Andrén, A. & Allmere, T. 1993.** Genetiska mjölkproteinvarianter och deras betydelse för produkternas kvalitet. Konferensrapport, Husdjurskonferensen 1993, Uppsala. SLU Info Rapport, Allmänt 181, Uppsala 1993, 116-121.
- Johansson, I & Rendel, J. 1963.** Ärfthlighet och husdjursförädling. LTs förlag. Stockholm.
- Johnson, P.E., Bush, L.J., Odell, G.V. & Smith, E.L. 1973.** The undesirable flavor in milk resulting from grazing cows on wheat pasture. *Oklahoma Agricultural Experimental Station MP-90:274-277.*
- Jordbruksverket, 1980.** Bevarande av genresurser hos husdjur. Betänkande avgivet av genbanksutredningen. Ds Jo 1980:6. Stockholm.
- Kantanen, J., Olsaker, I., Holm, L-E., Lien, S., Vilkki, J., Brusgaard, K., Eythorsdottir., Danell, B. & Adalsteinsson, S. 2000.** Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *Journal of Heredity* 91:446-457.
- Kaupe, B., Winter, A., Fries, R. & Erhardt, G. 2004.** DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Research* 71:182-187.
- Kühn, C., Thaller, G., Winter, A., Bininda-Emonds, O.R.P., Kaupe, B., Erhardt, G., Bennewitz, J., Schwerin, M. & Fries, R. 2004.** Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* 167:1873-1881.
- Larsson, G. 2004.** Plan för avel med nötboskap av rasen Svensk Rödkulla. *Rödkullan* 3/04.
- Larsson, G. 2003.** Hur bevara rödkullerasen i framtiden??.
- Larsson, N-E. & Olsson, S-O. 2005.** Husdjursstatistik, 2005. Svensk Mjolk. Eskilstuna.
- Leone, P., Scaltriti, A., Caroli, A., Sangalli, S., Samore, A. & Pagnacco, G. 1998.** Effects of CASK E variant on milk yield indexes in Italian Holstein Friesian bulls. *Animal Genetics* 29 (suppl. 1): 63
- Lien, S., Kantanen, J., Olsaker, I., Holm, L-E., Eythorsdottir, E., Sandberg, K., Dalsgard, B. & Adalsteinsson, S. 1999.** Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. *Animal Genetics* 30:85-91.
- Lindberg, E., Andersson, I., Lundén, A., Holm-Nielsen, J., Everitt, B., Bertilsson, J. & Gustafsson, A. 2004.** Orsaker till avvikande lukt och smak i leverantörmjolk. Svensk Mjolk, Lund. Rapport nr 7028-P 2004-02-23. 99 pp.
- Lodes, A., Buchberger, J., Krause, I., Aumann, J. & Klostermeyer, H. 1996.** The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 2. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. *Milchwissenschaft* 51:543-547.
- Lum, L., Dovic, P & Medrano, J. F. 1997.** Polymorphisms of bovine beta-lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of Activator Protein-2 transcription factor. *Journal of Dairy Science.* 80:1389-1397.
- Lundén, A., Nilsson, M., Janson, L. 1997.** Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science.* 80:2996-3005.
- Lundén, A., Gustafsson, V., Imhof, M., Gauch, R. & Bosset, J-O. 2002^a.** High trimethylamine concentration in milk from cows on standard diets is expressed as fishy off-flavour. *Journal of Dairy Research* 69:383-390.

- Lundén, A., Marklund, S., Gustafsson, V., Andersson, L. 2002^b.** A nonsense mutation in the *FMO3* gene underlies fishy off-flavor in cow's milk. *Genome Research* 12:1885-1888.
- Lundén, A. 2005.** Genetic markers of milk quality in cows. In: *Indicators of Milk and Beef Quality*. EAAP publication No. 112, Wageningen Academic Publishers. Edited by J.F. Hocquette and S. Gigli, pp 33-46.
- Macheboeuf, D., Coulon, J.B. & D'Hour, P. 1993.** Effects of breed, protein genetic variants and feeding on cow's milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research* 60:43-54.
- Maijala, K. 1982.** Motiv för bevarande av genresurser hos husdjur. Seminar om genbank for husdyr. RALA report nr 100. Reykjavik.
- McLean, D., Graham, B., Ponzoni, R. 1984.** Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research* 51:531-546.
- Mercier, J.C. & Grosclaude, F. 1999.** The molecular genetics of milk proteins and their genes. In *Biology of Lactation*. Paris 1999.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. & Monardes, H.G. 1984.** Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk-, fat-, and protein-production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 67: 835-840.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. & Monardes, H.G. 1986.** Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 69:22-26.
- Ng-Kwai-Hang, .F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. & Monardes, H.G. 1987.** Variation in milk protein constructions associated with genetic polymorphism and environmental factors. *Journal of Dairy Science* 70:563-570.
- Näslund, J., Pielberg, G., & Lundén, A. 2004.** Frequency of the bovine DGAT1 (K232A) polymorphism in selection lines with high and low milk fat content. SLU, Uppsala, Sweden. Abstract from the 55th EAAP Annual meeting in Bled, Slovenia, 5-9 September 2004, page 5.
- Näslund, J. 2004.** Milk fat content and composition in cow's milk. PM in the PhD course Molecular genetics for domestic animals, 2004-11-09. Institutionen för husdjursgenetik.
- Ojala, M., Famula, T.R. & Medrano, J.F. 1997.** Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *Journal of Dairy Science* 80:1776-1785.
- Prosser, C.G., Turner, S-A., McLaren, R.D., Langley, B., L'Huillier, P.J., Molan, P. & Auldist, M.J. 2000.** Milk whey protein concentration and mRNA associated with beta-lactoglobulin phenotype. *Journal of Dairy Science* 67:287-293.
- Rendel, J. 1995.** Bevarande av genetisk mångfald hos husdjur. Varför bör det ske, vad ska bevaras och hur ska det gå till? Konferensrapport 1995. Lantbruksvetenskapliga fakulteten SLU Info. s192-199.
- Rijnkels, M., Kooiman, P.M., de Boer, H.A. & Pieper, F.R. 1997.** Organization of bovine casein gene locus. *Mammalian Genome* 8:148-152.
- Riquet, J., Coppieters, W., Cambisano, N., Arranz, J-J., Berzi, P., Davis, S.K., Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Simon, P., Taylor, J.F., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Womack, J.E., Georges, M. 1999.** Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Genetics* 96: 9252-9257.
- Robitaille, G., Britten, M., Morisset, J. & Petitclerc, D. 2002.** Quantitative analysis of beta-lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows beta-lactoglobulin AB throughout lactation. *Journal of Dairy Science* 69:651-654.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P. 1998.** Sequencing method on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363-364.
- Rödkullan. 2005.** Rödkulletjurar i semin och privat genom åren. Sveriges Rödkulleförening.

- Schaar, J. 1984.** Effects of kappa-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. *Journal of Dairy Research* 51:397-406.
- Schaar, J., Hansson, B. & Pettersson, H-E. 1985.** Effects of genetic variants of kappa-casein and beta-lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research* 52:429-437.
- Smith, S.J., Cases, S., Jensen, D.R., Chen, H.C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D.A., Raber, J., Eckel, R.H & Farese, R.V. Jr. 2000.** Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking *DGATI*. *Nature Genetics* 25:87-90.
- Spelman, R.J., Ford, C.A., McElhinney, P., Gregory, G.C. & Snell, R.G. 2002.** Characterization of the *DGATI* gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*. 85:3514-3517.
- Sveriges Rödkulleförening.** Svensk rödkullig boskap. Broschyr.
- Thaller, G., Krämer, W., Winter, A., Kaupe, B., Erhardt, G., Fries, R. 2003.** Effects of *DGATI* variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal of Animal Science* 18:6935-6942.
- Threadgill, D.W. & Womack, J.E. 1990.** Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research* 12:3895-3907.
- Walstra, P & Jenness, R. 1984.** Proteins. In: *Dairy Chemistry and Physics*, USA: John Wiley & Sons, pp. 99-122.
- Winter, A., Krämer, W., Werner, F., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J., Thaller, G., Fries, R. 2002.** Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:9300-9305.
- White, W.T & Ibsen, H.L. 1936.** Horn inheritance in Galloway-Holstein cattle crosses. *Journal of Genetics* 32:33-49.

Internet hemsidor

Svensk Avels hemsida. www.svavel.se/databas/rak_tjur.asp

ViaLactia Biosciences hemsida. www.vialactia.com/index.asp

Personliga meddelanden:

Larsson, G. 2005. Personligt meddelande. 2005-05-07.

Torén, K. 2005. Personligt meddelande. 2005-05-07.

Woollard, John R. University of Wisconsin (2001-06-01; *personligt meddelande*).

BILAGOR

1
Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-
20
Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-
40
Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-
60
Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-
80
Asp-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His
Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-
136
Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Ile-Glu-Ala-Val-Glu-
Thr (A-varianten)
148
Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Ala-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-
(A-varianten) Asp | Gly (E-varianten)
P
169
Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val

Bilaga 1. Aminosyrasekvens av κ -kasein B-allelen. Substitutionerna som utmärker varianterna A (Eigel *et al.*, 1984) och E är angivna i fetstil (Mercier & Grosclaude, 1999).

1 20
 Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Val-Ala-GlyThr-Trp-Tyr-
 40
 Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-
 80
 Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-
 100
 Trp-Glu-Asn-**Gly**-Glu-Cys-Ala-Gln-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-
 Asp (A-varianten)
 110
 Val-Phe-Lys-Ile-Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-
 118 120
 Lys-Tyr-Leu-Leu-Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-Pro-Glu-Gln-Ser-Leu-**Ala**-Cys-Gln-
Gly (A-varianten)
 140
 Cys-Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-
 160
 Lys-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-Glu-Glu-Gln-Cys-
 162
 His-Ile

Bilaga 3. Aminosyrasekvens av β -laktoglobulin B-allelen. Substitutionerna som utmärker A-varianten är angivna i fetstil (Eigel *et al.*, 1984).

Bilaga 5. Innehållsförteckning för buffert A.

Sucrose	219 g (0,32 M)
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	20 ml (10 mM)
1 M Magnesium klorid	10 ml (5 mM)
Tritton X-100	20 g (1 %)
Total volym	destillerat vatten upp till 2 l

Bilaga 6. Innehållsförteckning för buffert D.

Kaliumklorid	3,7 g (50 mM)
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 ml (10mM)
Magnesiumklorid. 6 H ₂ O	0,6 g (2,5 mM)
NP 40	4,5 g (0,45 %)
Tween 20	4,5 g (0,45 %)
Total volym	destillerat vatten upp till 1 l

Bilaga 7. Använda PCR-primers, position och PCR-produktens längd

	Primerpar	PCR-produktens längd (bp)
β -kasein B	PSO 61B PSO64	111
β -kasein A	PSO 63B PSO 62	190
β -kasein A1	PSO 63 PSO 62B	190
κ -kasein A	PSO 74 PSO 75B	139
κ -kasein B	PSO 74B PSO 75	139
β -lakto-globulin	PSO 78B PSO 79	484
<i>FMO3</i>	F3e6F2 F3e6R2	147
<i>DGAT1</i>	F R	182

Bilaga 8. Protokoll för PCR-analys, β -laktoglobulin och kaseingenerna.

PCR-mix	Kasein (μ l)	β -laktoglobulin (μ l)
10 x HotStarTaq PCR buffert	2	2
MgCl ₂ (25mM)	1.6	
dNTP (20 mM)	0.2	0.2
Upper primer (10 μ M)	1	0.5
Lower primer (10 μ M)	1	0.5
HotStarTaq DNA polymeras (5 U/ μ l)	0.1	0.1
DNA	1	3
H ₂ O	13.1	13.7
Total volym:	20	20

Bilaga 9. Protokoll för PCR-analys, *DGAT1* och *FMO3*.

PCR-mix	<i>FMO3</i> (μ l)	<i>DGAT1</i> (μ l)
10 x PCR buffert II	2	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1	1,75
dNTP (20 mM av varje)	0,2	0,25
F primer (10 μ M)	0,5	0,5
R primer (10 μ M)	0,5	0,5
AmpliTaq DNA polymeras (5 U/ μ l)	0,14	0,3
DNA	2,5	3
H ₂ O	13,16	11,2
Betain		5
Total volym:	20	25

Bilaga 10. Använda sekvensprimrar, deras position samt respektive DNA-sekvenser

	Sekvensprimer	Sekvens 5'-3'
Betakasein B	PSO 68	GAT GTT TTG TGG GAG GCT GT
Betakasein A	PSO 67	CAA CAT CAG TGA GAG TCA GG
Betakasein A1	PSO 65A	TGG CTC CTA AGC A
Kappakasein A	PSO 76	CTC CAG AAG TTA TTG AG
Kappakasein B	PSO 77	CTC AAT AAC TTC TGG AG
Betalaktoglobulin	PSO 72A	TGA TCT TCT TCT TCT GAG CAC
<i>FMO3</i>	F3e6R3	TGA GGA ATG TTT CAA ATC
<i>DGAT1</i>	DGAT1 seq	GCT CGT AGC TTT GGC AGG TA

Bilaga 11. PCR-program som användes vid uppförökningen av de variabla DNA-segmenten för respektive gen.

β -kasein

95° C 10 min
50X(95°C 45s, 65°C 45s, 72°C 60s)
72°C 5 min
4°C

κ -kasein

95° C 10 min
50X(95°C 45s, 56°C 45s, 72°C 60s)
72°C 5 min
4°C

β -laktoglobulin

95° C 10 min
50X(95°C 45s, 63°C 45s, 72°C 60s)
72°C 5 min
4°C

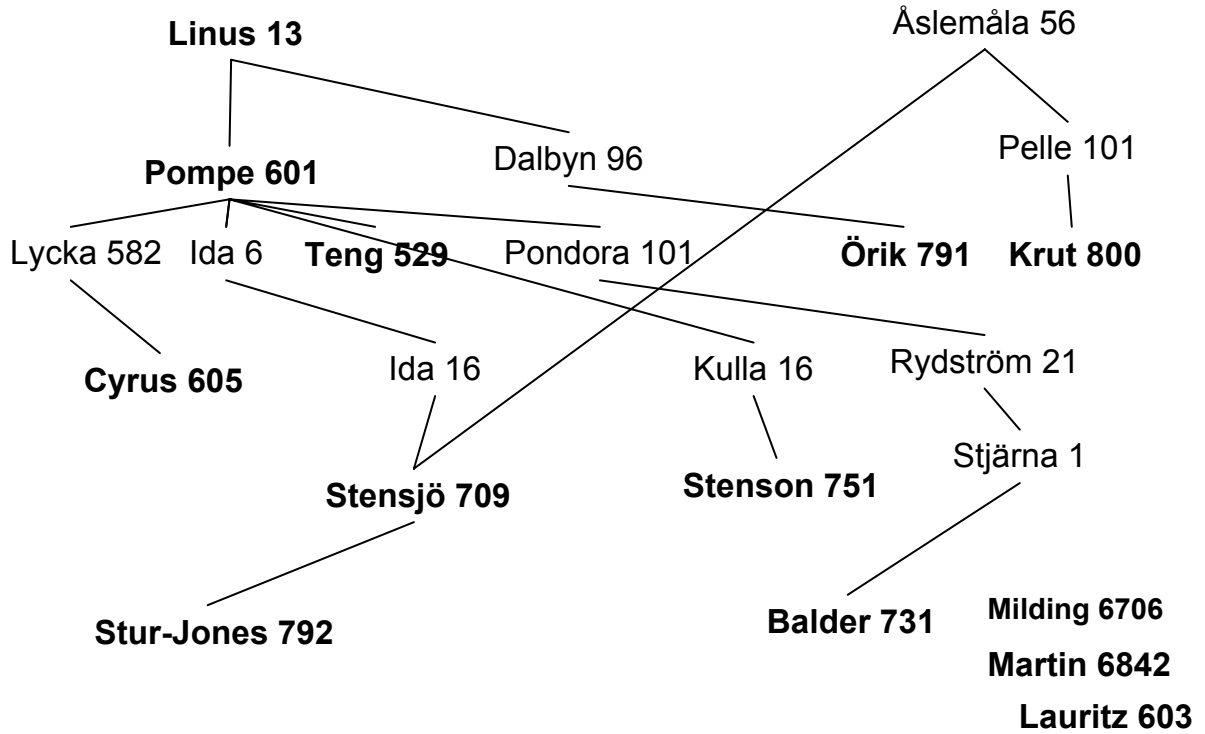
FMO3

94°C 6 min
5X(94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s)
43X(94°C 20s, 50°C 30s, 72°C 45s)
72°C 5 min
4°C

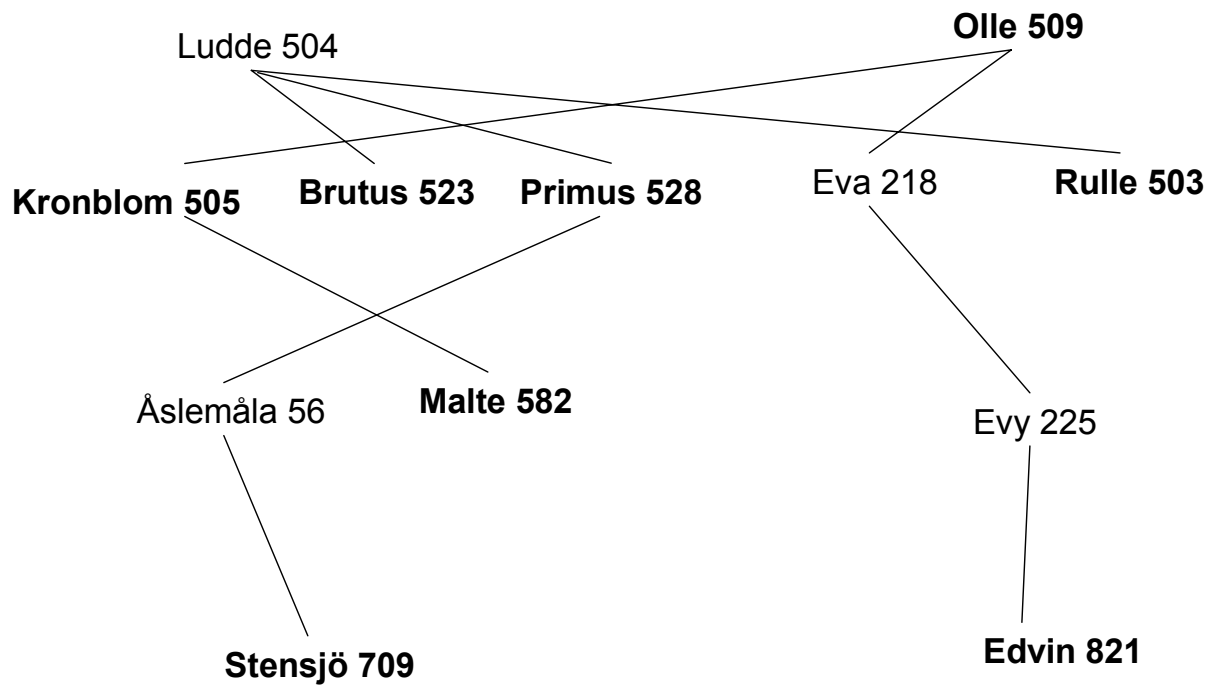
DGATI

95°C 10 min
5X(94°C 60 s, 59°C 45s, 72°C 45s)
40X(94°C 60s, 58°C 30s, 72°C 30s)
72°C 10 min
4°C

Bilaga 12. Tjurar markerade med fetstil är konstaterat heterozygota för κ -kasein E-allelen (bär en kopia av allelen)



Bilaga 13. Tjurar i fetstil är konstaterat heterozygota för ”räkgenen” (bär en kopia av X-allelen) medan övriga individer i släktrödet saknar genotypbestämning men är möjliga bärare av allelen i fråga.



Bilaga 14. Genotypresultat för 65 avelstjurar av Rödkulleras avseende fem gener med betydande effekt på mjölkens kvalitet.

<u>Ras</u>	<u>Kod</u>	<u>Namn</u>	<u>β-CN</u>	<u>κ-CN</u>	<u>β-LG</u>	<u>FMO3</u>	<u>DGAT1</u>
blandad	6799	Ettma	A1A2	AB	BB	RR	AK
svenskx	6842	Martin	A1A1	BE	BB	RR	AA
östnorsk							
västnorsk	947	Frippo	A1A2	AB	AA	RR	AA
finskx	1334	Mesir	A1A2	AA	AB	RR	AA
svensk							
svensk	3013	Linus	A1A2	BE	AB	RR	AA
västnorsk	6706	Milding	A2A2	BE	AB	RR	AA
svensk	6727	Nestor	A1A2	AA	BB	RR	AA
östnorsk	6729	Kron	A1A2	AB	BB	RR	AA
västnorsk	6739	Mild	A1A2	AB	AA	RR	AA
xsvensk							
finsk	6789	Jerry	A1A1	AA	BB	RR	AA
svensk	503	Rulle	A1A2	AB	BB	RX	AA
svensk	505	Kronblom	A1A2	AB	AB	RX	AA
östnorsk	507	Jadargut	A1B	BB	BB	RR	AA
svensk	508	Pelle	A1A2	AA	BB	RR	AA
svensk	509	Olle	A1A2	AA	BB	RX	AA
svensk	523	Brutus	A1A1	AA	BB	RX	KK
svensk	524	Tertius	A1A1	AB	BB	RR	AA
östnorsk	538	Ceasar	A1A2	BB	BB	RR	AK
västnorsk	539	Husar	A1A1	AB	AB	RR	AA
svenskx	540	Quadrat	A2A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svensk	601	Pompe	A1A1	BE	BB	RR	AA
svenskx	602	Röland	A2A2	AA	AB	RR	AA
västnorsk							
svensk	603	Lauritz	A1A2	BE	AB	RR	AA
svenskx	604	Rambo	A1A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskx	605	Cyrus	A1A2	BE	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskx	606	Romeo	A2A2	AB	AB	RR	AA
östnorsk							
svenskx	607	Nilsas	A2A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
östnorsk	3005	Kronilen	A2A2	AB	AB	RR	AA
västnorsk	510	Tjugum	A1A1	AA	AA	RR	AK
västnorsk	511	Bale	A2A2	BB	BB	RR	AA
svensk	528	Primus	A1A1	AA	BB	RX	AA
svensk	529	Teng	A2A2	BE	BB	RR	AA
västnorsk	531	Galdar	A1A2	AA	AB	RR	AA
svensk	557	Bert	A2A2	AB	BB	RR	AA
svensk	582	Malte	A2A2	AB	BB	RX	AA
svensk	585	Viking	A2A2	AA	BB	RR	AA
östnorsk	586	Enok	BB	BB	BB	RR	AK
svensk	709	Stensjö	A1A2	BE	AB	RX	AA
svenskx	729	Bruse	A1A2	AA	AB	RR	AA
östnorsk							
svenskx	730	Andreas	A1A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskx	731	Balder	A1A1	BE	AA	RR	AA
östnorskx							
västnorsk							

svensk	732	Örtjärn	A2B	AB	BB	RR	AA
svenskkx	747	Ante	A1A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskkx	749	Baron	A2A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskkx	750	Fritz	A2B	BB	BB	RR	AA
östnorsk							
svensk	751	Stenson	A1A1	BE	AB	RR	AA
svenskkx	754	Pegasus	A1A2	AA	AB	RR	AA
östnorsk							
svensk	758	Klang	A1A1	BB	BB	RR	AA
finskkx	759	Envik	A2A2	AA	BB	RR	AA
svensk							
svenskkx	760	Staverhult	A1A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskkx	764	Sunnanhe d	A1A2	AA	BB	RR	AA
östnorskkx							
finsk							
svenskkx	767	Julius	A1A2	AB	AB	RR	AA
östnorsk							
svensk	769	Vermuth	A1A2	AB	AB	RR	AA
svensk	791	Örik	A1A2	BE	BB	RR	AK
svensk	792	Stur Jones	A1A2	BE	AB	RR	AA
svensk	798	Torsby	A1A1	AA	BB	RR	AA
blandad	799	Perra	A1A2	AB	BB	RR	AA
svenskkx	790	Obelix	A2A2	AB	BB	RR	AA
östnorsk							
svenskkx	811	Toftsbyn	A2A2	BB	BB	RR	AA
östnorsk							
svensk	812	Knutte	A2A2	AA	BB	RR	AA
svensk	800	Krut	A1A2	AE	BB	RR	AA
	821	Edvin	A2A2	AB	AB	RX	AK
svensk	822	Knall	A2A2	AA	BB	RR	AA
svenskkx	584	Rasmus	A1A2	AB	AB	RR	AA
östnorsk							
finsk	9950	Jere	A2A2	AA	BB	RR	AK