

## IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN $\beta$ -KASEIN (CSN2) PADA KAMBING PERANAKAN ETAWAH, SAANEN DAN PERSILANGANNYA DENGAN METODE PCR-SSCP

[Identification of  $\beta$ -Casein Gene Variability (CSN2) in Etawah Grade, Saanen and PESA Goats by PCR-SSCP Method]

F. SAPUTRA, S. DARWATI, R.R.A. MAHESWARI dan C. SUMANTRI

Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor

### ABSTRACT

$\beta$ -casein gene is directly related to the quality and properties of milk. A protocol for rapid and simultaneous genotyping of  $\beta$ -casein alleles in goat was conducted by single strand conformational polymorphism polymerase chain reaction (SSCP-PCR) method. Screening of  $\beta$ -casein gene variability in 3 dairy goat breeds was conducted to: Etawah Grade (77 samples), Saanen (67 samples) and PESA (Crossbreed Etawah Grade with Saanen) (29 samples) in Bogor and Sukabumi. The objective of this research was to identify polymorphism of the  $\beta$ -casein (CSN2) gene in dairy goat. Result showed that three alleles of the  $\beta$ -casein gene is CSN2\*A, CSN2\*C, dan CSN2\*O. In most breeds, CSN2\*O occurred in the lowest frequency. The identification of the CSN2 gene variability in the goat breeds indicated the predominance of the A allele. The CSN2\*A allele had a high frequency in Saanen in Cijeruk (0.66); Etawah Grade in Cariu (0.62); and PESA in Cariu (0.54). While the CSN2\*C allele had a high frequency in PESA in Balitnak (0.83); Etawah Grade in Ciapus (0.48); and Saanen in Taurus (0.38). Based on the result of chi-square analysis, it was found out that Saanen in Cariu and Taurus was not in Hardy-Weinberg equilibrium.

**Key Words:** Dairy Goat, B-Kasein Gene (CSN2), SSCP

### ABSTRAK

Gen  $\beta$ -kasein berpengaruh langsung terhadap kualitas dan sifat susu. Sebuah protokol yang cepat untuk simultan genotipe alel  $\beta$ -kasein telah dilakukan oleh untai tunggal konformasi metode polimorfisme *polymerase chain reaction* (SSCP-PCR) pada kambing. Pencarian variasi gen  $\beta$ -kasein dilakukan terhadap tiga jenis kambing, yaitu Peranakan Etawah (77 sampel), Saanen (67 sampel) dan PESA (Persilangan PE dengan Saanen) (29 sampel) di Bogor dan Sukabumi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi polimorfisme dari gen  $\beta$ -kasein (CSN2) pada kambing perah. Penelitian menemukan tiga alel dari gen  $\beta$ -kasein, yaitu CSN2\*A, CSN2\*C, dan CSN2\*O. Pada sebagian besar kambing, CSN2\*O memiliki frekuensi yang terendah. Identifikasi keragaman gen CSN2 pada jenis kambing perah menunjukkan dominasi alel A. Alel CSN2\*A memiliki frekuensi yang tinggi, pada kambing Saanen di Cijeruk (0,66), PE (Peranakan Etawah) di Cariu (0,62), dan PESA (Persilangan PE dengan Saanen) di Cariu (0,54). Alel CSN2\*C memiliki frekuensi yang tinggi, pada kambing PESA di Balitnak (0,83); PE di Ciapus (0,48); dan Saanen di Taurus (0,38). Hasil analisis *chi-square*, menunjukkan pada kambing Saanen di lokasi Cariu dan Taurus tidak dalam keseimbangan Hardy-Weinberg.

**Kata Kunci:** Kambing Perah, Gen  $\beta$ -kasein (CSN2), SSCP

### PENDAHULUAN

Kambing perah merupakan salah satu ternak alternatif yang banyak digunakan sebagai hewan ternak penghasil susu selain sapi perah. Jumlah produksi susu segar di

Indonesia sebanyak 647 ton pada tahun 2008 (DITJENNAK, 2008). Impor produk susu pada tahun 2008 di Indonesia sebesar 665.159,5 ton (BADAN PUSAT STATISTIK, 2008). Data tersebut menunjukkan produksi susu nasional belum mampu memenuhi seluruh kebutuhan

konsumsi nasional. Konsumsi susu dan impor susu akan terus meningkat, sehingga perlu peningkatan populasi ternak perah, efisiensi produksi susu dan diversifikasi ternak perah. Populasi kambing di Indonesia pada tahun 2008 berjumlah sekitar 15.147.432 ekor (DITJENNAK, 2008). Pemeliharaan kambing perah merupakan salah satu alternatif dalam upaya diversifikasi ternak perah dan peningkatan produksi susu.

Indonesia memiliki beberapa jenis ternak kambing perah, yaitu kambing Saanen, Peranakan Etawah dan PESA yang merupakan kambing persilangan Peranakan Etawah dan Saanen. Salah satu upaya untuk memperbaiki produksi dan kualitas susu kambing adalah dengan seleksi dan persilangan. Bidang genetika molekuler dengan kemajuan teknologi saat ini dapat melakukan seleksi dengan mengidentifikasi keragaman pada tingkat DNA termasuk  $\beta$ -kasein. Dalam rangka memperbaiki produksi dan kualitas susu kambing perah dilakukan suatu upaya, yaitu dengan mengidentifikasi keragaman gen  $\beta$ -kasein. Salah satu metode analisis yang mempunyai keunggulan untuk mengidentifikasi polimorfisme gen adalah PCR-SSCP. Keragaman gen  $\beta$ -kasein pada kambing perah di Indonesia telah berhasil diidentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism* (PCR-SSCP). PCR-SSCP merupakan metode yang sensitif dalam mendeteksi adanya keragaman DNA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen  $\beta$ -kasein (CSN2) pada kambing Peranakan Etawah, Saanen dan PESA (Persilangan Peranakan Etawah dan Saanen) dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism* (PCR-SSCP).

## MATERI DAN METODE

### Sampel darah dan bahan ekstraksi DNA

Sampel darah kambing betina yang digunakan berjumlah 173 sampel yang terdiri dari kambing Saanen (77) di lokasi Ciapus (16), Cariu (21) dan Elang 45 (40); kambing PE (67) di lokasi Cijeruk (19), Cariu (23) dan

Taurus Dairy Farm (25); dan kambing PESA (29) di lokasi Cariu (14) dan Balitnak (15). Bahan-bahan yang digunakan untuk mengekstraksi DNA adalah TE (*Tris* EDTA), STE (*Sodium Tris*-EDTA), NaCl, SDS, CIAA (*Chloroform iso amil alcohol*) dan etanol absolut.

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode SAMBROOK *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi. Keseluruhan sampel darah yang disimpan dalam etanol 95% disentrifugasi 3500 rpm selama 5 menit. Sampel tersebut dicampurkan dengan menggunakan *buffer lisis sel* (350  $\mu$ l 1  $\times$  STE, dan 40  $\mu$ l 10% SDS) dan 20  $\mu$ l proteinase-K. DNA dimurnikan dengan metode fenol-kloroform, yaitu dengan menambahkan 40  $\mu$ l 5 M NaCl dan 800  $\mu$ l etanol absolut. Endapan dicuci dengan menambahkan 400  $\mu$ l, etanol 70%, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, etanol dibuang dan diuapkan menggunakan pompa vakum, selanjutnya DNA dilarutkan dengan 80  $\mu$ l *buffer* TE 80%.

### Amplifikasi DNA

Campuran untuk mengamplifikasi DNA dalam mesin PCR terdiri dari 1  $\mu$ l sampel DNA; 0,1  $\mu$ l Primer; 0,1  $\mu$ l dNTP; 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>; 1,25  $\mu$ l *DreamTaq Buffer*; 0,05  $\mu$ l *Taq* dan 8,5  $\mu$ l air destilasi untuk volume akhir 12  $\mu$ l. Proses amplifikasi terjadi dalam 30 siklus terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi akhir pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 60°C selama 45 detik, pemanjangan DNA (ekstensi awal) pada suhu 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi DNA dianalisis dengan elektroforesis.

### Pendeteksian keragaman gen $\beta$ -kasein dengan metode (PCR-SSCP)

Produk PCR gen  $\beta$ -kasein sebanyak 5  $\mu$ l disuspensikan dalam larutan *formamide dye* sebanyak 5  $\mu$ l, kemudian diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 95°C selama 7 menit.

Setelah itu, segera didinginkan dengan *ice bath* selama 2 menit. Konformasi untai DNA dideteksi menggunakan PAGE 10%. Alat elektroforesis diatur pada tegangan 350 V selama 20 jam pada suhu 4°C. Perbedaan konformasi disebabkan oleh adanya mutasi minimal satu basa sehingga terjadi perbedaan migrasi pada pita DNA.

### Pewarnaan perak

Pewarnaan perak dilakukan dengan cara merendam gel dalam larutan A (200 ml air destilasi, 0,20 g AgNO<sub>3</sub>, 80 µl 10 N NaOH dan 800 µl amonia) selama 8 menit kemudian gel dibilas menggunakan air destilasi selama 1 menit. Pencucian selanjutnya menggunakan larutan B (6 g NaOH, 200 ml air destilasi dan 200 µl formaldehid dipanaskan pada suhu 60°C) sampai pita muncul. Bila muncul pita, larutan B dibuang kemudian gel direndam dalam larutan asam asetat (100 ml air destilasi dan 100 µl asam asetat) untuk menghentikan reduksi perak.

### Analisis data

#### Frekuensi genotipe

Keragaman genotipe tiap-tiap individu dapat ditentukan dari migrasi pita-pita DNA. Frekuensi genotipe merupakan rasio dari jumlah suatu genotipe terhadap jumlah populasi. Model matematika frekuensi genotipe (NEI dan KUMAR, 2000):

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{N}$$

$X_{ii}$  : Frekuensi genotipe ke-ii  
 $n_{ii}$  : Jumlah sampel bergenotipe ii  
 $N$  : Jumlah seluruh sampel

#### Frekuensi alel

Frekuensi alel merupakan rasio relatif suatu alel terhadap keseluruhan alel pada suatu lokus dalam populasi. Masing-masing sampel diperbandingkan berdasarkan ukuran (*marker*) yang sama dan pita-pita DNA hasil SSCP diidentifikasi kemudian hasil identifikasi

dihitung frekuensi alelnya dengan merujuk pada rumus (NEI dan KUMAR, 2000):

$$X_i = \frac{(2 n_{ii} + \sum_{i \neq j} n_{ij})}{2N}$$

$X_i$ : Frekuensi alel ke-i  
 $n_{ii}$ : Jumlah sampel yang bergenotipe ii  
 $n_{ij}$ : Jumlah sampel yang bergenotipe ij  
 $N$ : Jumlah seluruh sampel

### Hukum keseimbangan Hardy-Weinberg

Pengujian nilai keseimbangan Hardy-Weinberg (HW) antara hasil pengamatan dan nilai harapan dapat diukur dengan menggunakan uji Chi-Kuadrat (NEI dan KUMAR, 2000):

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$\chi^2$ : Chi-Kuadrat  
 $O$ : Nilai pengamatan  
 $E$ : Nilai harapan

Suatu populasi dikatakan seimbang jika nilai  $\chi^2$  yang didapatkan lebih kecil daripada  $\chi^2$  tabel pada selang kepercayaan 5% dan derajat bebas tertentu. Derajat bebas dihitung dengan rumus:

Derajat bebas = genotipe – alel  
 (NEI dan KUMAR, 2000).

### Heterozigositas

Ketika frekuensi alel dipelajari di banyak lokus, tingkat keragaman genetik dalam sebuah populasi biasanya diukur dengan rata-rata keanekaragaman gen, yang sering disebut rata-rata heterozigositas (WEIR, 1996). Keragaman gen pada suatu lokus dapat dilambangkan sebagai berikut:

$$H = \sum_{i \neq j} \frac{N_{ij}}{N}$$

$H$  : Nilai heterozigositas  
 $N_{ij}$ : Jumlah individu heterozigot pada lokus ke-1  
 $N$  : Jumlah individu yang diamati

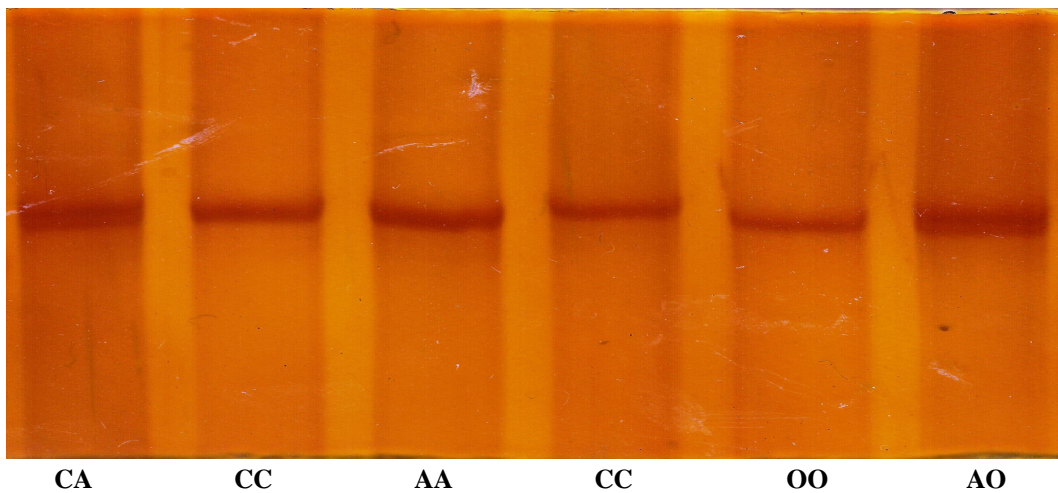
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pendeteksian keragaman gen $\beta$ -kasein

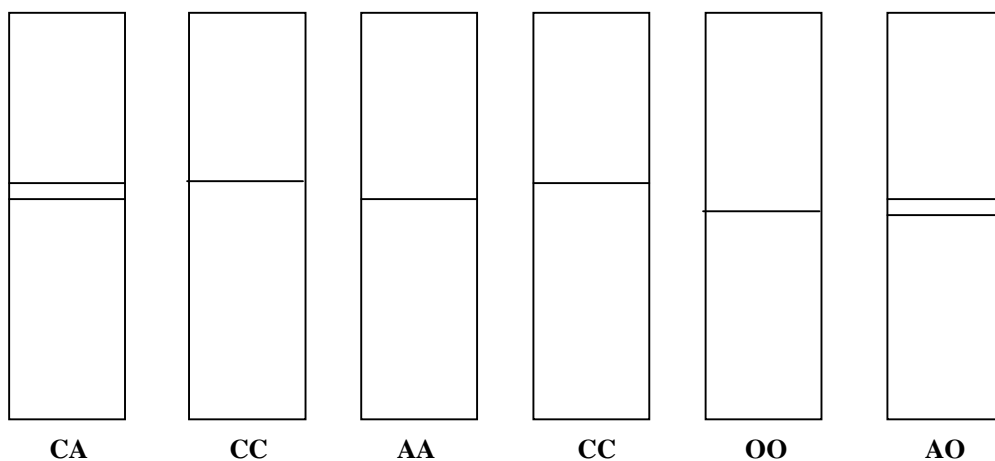
Pendeteksian keragaman gen  $\beta$ -kasein pada ekson tujuh dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP). Dalam analisis SSCP, pendeteksian keragaman diketahui dengan adanya perubahan basa nukleotida yang mempengaruhi bentuk dari fragmen DNA untai tunggal (BASTOS *et al.*, 2001) yang menyebabkan perbedaan pola

migrasi pada saat elektroforesis dalam gel poliakrilamida (BAROSO *et al.*, 1999) walaupun perbedaannya hanya satu nukleotida saja (NATARAJ *et al.*, 1999). Hasil pendeteksian keragaman gen  $\beta$ -kasein menggunakan metode PCR-SSCP pada gel poliakrilamida 10% divisualisasikan pada Gambar 1 dengan Genotipe CA, CC, AA, OO, dan AO yang direkonstruksi pada Gambar 2.

Hasil Pendeteksian keragaman genotype dengan metode PCR-SSCP sangat bergantung kepada perubahan bentuk dari ikatan utas tunggal DNA. Menurut GASSER *et al.* (2006),



**Gambar 1.** Visualisasi pola pita gen  $\beta$ -kasein pada gel poliakrilamida 10% dengan metode PCR-SSCP



**Gambar 2.** Rekonstruksi pola pita gen  $\beta$ -kasein pada kambing PE, Saanen dan PESA

konformasi dalam metode SSCP dipengaruhi oleh panjang fragmen, urutan, lokasi, dan jumlah pasangan basa. Oleh karena itu, mutasi pada posisi nukleotida tertentu dalam urutan primer dapat mengubah konformasi molekul. Ketika dipisahkan dalam gel *non-denaturing*, molekul berbeda dengan nukleotida tunggal. Hasil Pendeteksian keragaman genotipe dengan metode PCR-SSCP sangat bergantung kepada perubahan bentuk dari ikatan utas tunggal DNA. Menurut GASSER *et al.* (2006), konformasi dalam metode SSCP dipengaruhi oleh panjang fragmen, urutan, lokasi, dan jumlah pasangan basa. Oleh karena itu, mutasi pada posisi nukleotida tertentu dalam urutan primer dapat mengubah konformasi molekul. Ketika dipisahkan dalam gel *non-denaturing*, molekul berbeda dengan nukleotida tunggal bisa diidentifikasi berdasarkan perubahan dalam mobilitas.

#### Frekuensi genotipe, alel dan heterozigositas

Pola migrasi utas tunggal DNA gen  $\beta$ -kasein pada gel poliakrilamida dalam penelitian ini bersifat polimorfik (beragam) dengan ditemukannya tiga alel, yaitu C, A dan O. Hal ini sesuai dengan pernyataan NEI dan KUMAR (2000) yang menyatakan jika terdapat dua alel atau lebih dengan nilai frekuensi relatif dalam populasi lebih dari 1% maka gen  $\beta$ -kasein disebut beragam (polimorfik). Hasil frekuensi genotipe gen  $\beta$ -kasein disajikan pada Tabel 1. Dalam penelitian CHESA *et al.* (2005) ditemukan lima genotipe, yaitu AC, CO, CC, AA, dan AO sedangkan genotipe OO tidak

ditemukan. Dalam penelitian ini tidak ditemukan individu dari ketiga bangsa kambing yang diteliti yang memiliki genotipe CO. Genotipe CA dan CC merupakan genotipe dengan frekuensi terbanyak dari kambing PE dan Saanen hampir di semua lokasi yang diteliti, kecuali kambing PESA yang memiliki genotipe AO lebih banyak. Hasil frekuensi alel dan heterozigositas gen  $\beta$ -kasein pada kambing PE, Saanen, dan PESA tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai heterozigositas tertinggi berturut-turut terdapat pada kambing Saanen di Cariu (0,91), kambing Saanen di Taurus (0,84) dan kambing PESA di Cariu (0,79). Heterozigositas menggambarkan adanya variasi genetik pada suatu populasi. Semakin tinggi nilai heterozigositas dalam suatu populasi maka semakin tinggi pula variasi genetik pada populasi tersebut (FERGUSON, 1980). Frekuensi alel O sangat kecil pada ketiga bangsa kambing dalam semua lokasi yang diamati dalam penelitian ini, hal ini sesuai dalam penelitian CHESA *et al.* (2005), bangsa-bangsa kambing yang berada di Italia memiliki frekuensi alel O yang rendah. Menurut SACCHI *et al.* (2005), alel O berhubungan dengan tingkat kasein yang rendah. Alel A merupakan alel dengan frekuensi tertinggi pada kambing PE, Saanen dan PESA yang berada di hampir semua lokasi dalam penelitian ini, kecuali pada kambing PE di Ciapus (0,33) dan PESA di Balitnak (0,17) Alel A merupakan alel yang berhubungan dengan kandungan  $\beta$ -kasein normal (SACCHI *et al.*, 2005).

**Tabel 1.** Frekuensi genotipe gen  $\beta$ -kasein pada kambing PE, Saanen dan PESA

Bangsa kambing	Lokasi (n)	Genotipe					
		CC	AA	OO	CA	CO	AO
PE	Ciapus (16)	0,50	0,19	0,00	0,31	0,00	0,00
	Cariu (21)	0,10	0,33	0,00	0,38	0,00	0,19
	Elang 45 (40)	0,30	0,25	0,00	0,38	0,00	0,07
Saanen	Cijeruk (19)	0,05	0,42	0,05	0,22	0,00	0,26
	Cariu (23)	0,04	0,04	0,00	0,57	0,00	0,35
	Taurus (25)	0,08	0,08	0,00	0,60	0,00	0,24
PESA	Cariu (14)	0,00	0,14	0,07	0,07	0,00	0,72
	Balitnak (15)	0,67	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00

**Tabel 2.** Frekuensi alel dan heterozigositas gen  $\beta$ -kasein pada kambing PE, Saanen dan PESA

Bangsa kambing	Lokasi (n)	Alel			Heterozigositas
		C	A	O	
PE	Ciapus (16)	0,66	0,34	0,00	0,31
	Cariu (21)	0,28	0,62	0,10	0,57
	Elang 45 (40)	0,48	0,48	0,04	0,45
Saanen	Cijeruk (19)	0,16	0,66	0,18	0,47
	Cariu (23)	0,33	0,50	0,17	0,91
	Taurus (25)	0,38	0,50	0,12	0,84
PESA	Cariu (14)	0,04	0,54	0,42	0,79
	Balitnak (15)	0,83	0,17	0,00	0,33

### Keseimbangan Hardy-Weinberg

Hukum Hardy-Weinberg menggambarkan keseimbangan suatu lokus dalam populasi diploid yang mengalami perkawinan secara acak yang bebas dari faktor yang berpengaruh terhadap terjadinya proses evolusi seperti mutasi, migrasi, dan pergeseran genetik (GILLESPIE, 1998). Hasil pengujian keseimbangan populasi kambing PE, Saanen, dan PESA disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 memperlihatkan bahwa kambing PE di lokasi Cariu berada dalam keseimbangan dengan nilai  $\chi^2$  sebesar 2,50 karena lebih kecil daripada nilai  $\chi^2$  Tabel 1 kecuali Elang 45 dengan nilai  $\chi^2$  sebesar 4,69 dan di lokasi Ciapus tidak dapat dianalisa karena derajat bebasnya nol. Kambing Saanen di lokasi Cijeruk berada dalam keseimbangan dengan nilai  $\chi^2$  sebesar 1,93 lebih kecil daripada nilai  $\chi^2$  Tabel 2, kecuali di lokasi Cariu dengan nilai  $\chi^2$  sebesar 16,12 dan Taurus dengan nilai  $\chi^2$  sebesar 12,43 karena lebih besar daripada nilai  $\chi^2$  Tabel 1. Kambing PESA di lokasi Cariu tidak berada dalam keseimbangan dengan nilai  $\chi^2$  sebesar 4,81 karena lebih besar daripada nilai  $\chi^2$  Tabel 1, sedangkan pada lokasi Balitnak tidak dapat dianalisis karena derajat bebasnya minus satu. Suatu populasi dikatakan seimbang jika nilai  $\chi^2$  yang didapatkan lebih kecil daripada  $\chi^2$  tabel pada selang kepercayaan 5% dan derajat bebas tertentu (NEI dan KUMAR, 2000).

**Tabel 3.** Hasil uji  $\chi^2$  terhadap populasi kambing PE, Saanen, dan PESA

Bangsa kambing	Lokasi (n)	$\chi^2$
PE	Ciapus (16)	td
	Cariu (21)	2,50 <sup>m</sup>
	Elang 45 (40)	4,69*
Saanen	Cijeruk (19)	1,93 <sup>m</sup>
	Cariu (23)	16,12*
	Taurus (25)	12,43*
PESA	Cariu (14)	4,81*
	Balitnak (15)	td

\*: Nyata; <sup>m</sup>: Tidak nyata pada taraf  $\alpha$ : 0,05; In: Banyaknya sampel; td: Tidak dapat dianalisis;  $L\chi^2$  Tabel 1: 3,841 (5%); dan  $\chi^2$  Tabel 2: 5,991 (5%).

### KESIMPULAN

Keragaman gen  $\beta$ -kasein pada kambing PE, Saanen dan PESA sangat tinggi dengan ditemukannya tiga alel, yaitu C, A dan O. Pada kambing PE di Cariu dan Elang 45, yaitu CC, AA, CA, dan AO. kambing Saanen di Cijeruk dan kambing PESA di Cariu ditemukan lima genotipe, yaitu CC, AA, OO, CA, dan AO. Alel A merupakan alel dengan frekuensi terbanyak pada kambing PE, Saanen, dan PESA yang berada di hampir semua lokasi dalam penelitian ini, kecuali pada kambing PE di Ciapus dan PESA di Balitnak.

**DAFTAR PUSTAKA**

- BADAN PUSAT STATISTIK. 2008. Statistik Peternakan 2008. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI, Jakarta. <http://www.ditjennak.go.id/> (17 Agustus 2010).
- BAROSO, A., S. DUNNER dan J. CANON. 1999. Technical note: Use of PCR-single strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine  $\beta$ -casein variants A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> and B. *J. Anim. Sci.* 77: 2629 – 2632.
- BASTOS, E., A. CRVADOR, J. AZEVEDO and H.G. PINTO. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5: 7 – 15.
- CHESSA, S., E. BUDELLI, F. CHIATTI, A.M. CITO, P. BOLA and A. CAROLI. 2005. Short communication: predominance of  $\beta$ -casein (CSN2) C allele in goat breeds reared in Italy. *J. Dairy Sci.* 88: 1878 – 1881.
- DITJENNAK. 2008. Statistik Peternakan 2008. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI, Jakarta. <http://www.ditjennak.go.id/> (17 Agustus 2010).
- FERGUSON, A. 1980. *Biochemical Systematics and Evolution Lecturer in Zoology*. The Queens University of Belfast, London.
- GASSER, R.B., M. HU, N.B. CHILTON, B.E. CAMPBELL, A.J. JEX, D. OTRANTO, C. CAFARCHIA, I. BEVERIDGE and X. ZHU. 2006. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Publishing Group* 1: 6.
- GILLESPIE, J.H. 1998. *Population Genetics, A Concise Guide*. The Johns Hopkins University Press, London.
- NATARAJ, A.J., I.O. GLANDER, N. KUSUKAWA and W.E. HIGHSMITH. 1999. *Single-Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis for Gel-Based Mutation Detection*. Wiley-VCH Verlag GmH, Wienheim.
- NEI, M. and KUMAR S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- SACCHI, P., S. CHESSA, E. BUDELLI, P. BOLLA, G. CERIOTTI, D. SOGLIA, R. RASERO, E. CAUVIN and A. CAROLI. 2005. Casein haplotype structure in five Italian goat breeds. *J. Dairy Sci.* 88: 1561 – 1568.
- SAMBROOK, J., F. FRITSCH and T. MINIATIS. 1989. *Molecular Cloning Laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- WEIR, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis: Method for Discrete Population Genetic Data*. 2<sup>nd</sup> Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA.