



selection in relation to further improvement of sheep breeds. However, the available information in the prevailing majority of literature sources on the quality of wool concerns sheep of meat-wool and wool-meat direction of productivity. As for sheep of meat production, in particular the newly created domestic breeds such materials are almost absent which determines the relevance of the work done.

The foregoing article presents the results of the laboratory evaluation of differences in quality indicators of wool of the Dnieper beef sheep breed in relation to their sex and genotype. The research objects are young ewes, heeders, ewes and tugging rams. The experiments have been conducted in the conditions of the analytical laboratory for evaluation of wool quality and the breeding center for sheep breeding of the Institute of animal sciences NAAS. The obtained data indicate that young ewes of the line 024/063 (M1) have a larger length of wool on the compared topographic areas of the fleece, such as on the back (by 23-69%), maw (by 25-30%), thigh (by 2,5-4,6%). The larger length of wool on maw is characteristic of ewes and tugging rams of this line. The sheep of all sex and age groups, which belonged to the line 024/063 (M1) are reported to be characterized with the highest wool alignment by length within the evaluated topographic areas of the fleece. In spite of the mentioned differences in the indicator of wool fineness, the examinee sheep of these groups are quite homogeneous. The wool fineness in the groups of ewes and young ewes is within the range of 58-60 quality assortments, while the wool fineness of the replacement heeders and the tugging rams is within the range of 56-60 quality assortments.

Keywords: tugging rams, heeders, ewe, wool, genotype, physical and technical parameters, young ewes.

DOI 10.32900/2312-8402-2022-128-94-104

УДК 575.113:63.27.082(477)

АНАЛІЗ РОЗПОДІЛУ ЧАСТОТ ГАПЛОТИПІВ ЗА ЛОКУСАМИ CSN2 ТА CSN3 У ПОПУЛЯЦІЇ КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ

Кулібаба Р. О., д. с.-г. н., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0003-1776-7147>

Сахацький М. І., д. б. н., професор, академік НААН України,

<https://orcid.org/0000-0002-6113-0226>

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Ляшенко Ю. В., к. с.-г. н., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0003-2747-476X>

Інститут тваринництва НААН

Проведено дослідження генетичної структури популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусами бета-казеїну (CSN2) та капа-казеїну (CSN3), проаналізований розподіл частот гаплотипів. Поліморфізм дослідних локусів визначали за використання методів AS-PCR (алель-специфічна ПЛР) у випадку з CSN2 та PCR-RFLP (рестрикційний аналіз) у випадку з CSN3. За результатами досліджень визначали частоти генотипів та алелей, значення фактичної (H_o) та очікуваної гетерозиготності (H_e), індекс фіксації Райта (F_{is}), ефективну кількість алелей (n_e). Частоти гаплотипів визначали шляхом розрахунку EM-алгоритму за використання програми EH+. Розрахунки стандартизованої міри відхили за зчепленням від рівноважного стану проводили з використанням програми 2LD. За результатами проведених досліджень виявлений поліморфізм за



обом дослідними локусами у популяції корів української чорно-рябої молочної породи. За локусом *CSN2* частота алелю A^1 склала 0,44; A^2 – 0,56. За локусом *CSN3* частота алелю A склала 0,80; алелю B – 0,20. За обома поліморфними локусами дослідна популяція корів знаходиться в стані генетичної рівноваги. За результатами аналізу розподілу частот гаплотипів з'ясовано, що найбільшу частоту зустрічальності (0,46) має гаплотип $CSN2^{A1}-CSN3^A$, найменшу (0,085) – $CSN2^{A2}-CSN3^B$. В дослідній популяції корів української чорно-рябої молочної породи не спостерігається порушення стану рівноваги за зчепленням ($D' = 0,33$; що суттєво менше за критичного значення) між виявленими алельними варіантами локусів *CSN2* та *CSN3*. Це свідчить про те, що розподіл частот гаплотипів є результатом особливостей розподілу частот відповідних алелів.

Ключові слова: **поліморфізм, популяція, корови, алель, генотип, гаплотип, зчеплення, маркер.**

На сьогодні молекулярно-генетичні методи досліджень є перспективним напрямом фундаментальної та прикладної генетики, зокрема, й селекції сільськогосподарських тварин. Використання маркер-асоційованої селекції дозволяє підвищити ефективність традиційних методів селекційно-плеємної роботи безпосередньою оцінкою тварин за генотипом.

У селекції молочної худоби до найбільш економічно значущих відносяться гени, продукти яких пов'язані з харчовою цінністю і технологічними властивостями молока.

За своїми властивостями всі білки молока можна поділити на дві групи: 82 % складають казеїни ($\alpha S1$ -, $\alpha S2$ -, β -, k -казеїни) і 18% – сироваткові білки (α - і β -лактоглобуліни) [1]. Алелі, що детермінують синтез білків молока, успадковуються кодомінантно та чітко діагностуються за використання молекулярно-генетичних методів. Переважна більшість досліджень стосується двох найбільш економічно значимих генів – бета-лактоглобуліну (β -*LG*) і капа-казеїну (k -казеїн, *CSN3*, k -*CN*), поліморфізм яких пов'язаний з молочною продуктивністю. Відомо 13 генетично обумовлених алельних варіантів гена β -*LG* [2], серед яких алель A асоціюється з більшою концентрацією лактоглобуліну в молоці.

Казеїни є основним джерелом амінокислот для молодого організму та задіяні в транспортуванні відповідної кількості фосфору і кальцію в молоці, необхідних для формування кісткової тканини. На відміну від інших трьох казеїнових білків, капа-казеїн за своїм амінокислотним складом подібний до фібрину та має властивість за результатами протеолізу формувати згустки [3]. Ця властивість досить давно використовується при виробництві сиру. На основі ДНК-аналізу екзонних ділянок гену *CSN3* виявлено декілька нуклеотидних замін та поліморфні сайти рестрикції, описано 9 алельних варіантів (A , B , C , E , F , G , H , I і $A1$), серед яких найбільш часто зустрічаються варіанти A та B [4, 5].

Відмінності між алелями A і B гену *CSN3* обумовлені двома точковими мутаціями: амінокислотної заміни треоніну на ізолейцин у положенні 136 поліпептидного ланцюга та аспарагінової кислоти на аланін у положенні 148 [5]. Вважається, що молоко яке містить варіант $CSN3^B$ має кращі технологічні характеристики переробки, більший вміст жиру в сирі та його вихід [4]. Генотип $CSN3^{BB}$ є бажаним для формування поголів'я корів, молоко яких використовується при виробництві твердих сирів. Варіабельність частот генотипів *CSN3* обумовлена породною належністю з одного боку та селекційною спрямованістю з іншого. Так, наприклад, у буйволів цей ген мономорфний за алелем B , а от в процесі голштинізації локальних порід частка його знижується [6, 7].



Останнім часом в країнах з розвиненим тваринництвом все більше уваги приділяється β -казеїновій фракції білка (*CSN2*). Відомо близько 60 однонуклеотидних мутацій (SNP) в екзонній частині гену та 12 алельних варіантів *CSN2* серед яких найбільш використовуваними в промисловому тваринництві є алелі A^1 і A^2 [8]. Мова йде про місенс мутацію C/A (rs:43703011) в 7 екзоні, яка призводить до зміни амінокислоти проліну (A^2) на гістидин (A^1). Продуктами цих алелів є так зване $A1$ і $A2$ молоко [9]. Ці білки бета-казеїну відрізняються однією амінокислотою, яка є причиною утворення у травному тракті людини бета-казоморфіну (у випадку з типом бета-казеїну $A1$), що й викликає низку патологічних ефектів. У свою чергу, використання $A2$ молока суттєво зменшує гострі симптоми неперетравлення коров'ячого молока. Продукція на основі $A2$ молока поступово поширюється на ринках таких країн як Нова Зеландія (2000), Австралія (2004), США (2003), Великобританія (2011), Китай (2013), Росія (2017) [10]. В останні роки, деяка зацікавленість стала з'являтися і серед наших вітчизняних господарств щодо типування корів за алелями β -казеїну [11, 12].

Слід зазначити, що чотири гени казеїнів ($\alpha S1$ -*CN*, $\alpha S2$ -*CN*, β -*CN*, k -*CN*) тісно пов'язані та організовані на 6-й хромосомі *B. taurus* (200-250 кб) в порядку: $\alpha S1$, β , $\alpha S2$ і k [5, 13]. Це робить дану конструкцію цікавою з точки зору дослідження нерівноважного зв'язку алельних варіантів цих генів. Гени $\alpha S1$ -, β - і $\alpha S2$ -казеїна найбільш тісно зчеплені і утворюють кластер на основі спільного еволюційного походження, тоді як ген k -*CN* віддалений від них не менш ніж 70 т.п.н. [5].

У цьому випадку інтерес виникає не тільки до поліморфізму окремих генів (наприклад – капа-казеїну), але й і до необхідності аналізу комплексних генотипів та гаплотипів обох перспективних локусів – бета- та капа-казеїнів. У цілому, у вітчизняній науковій літературі зустрічаються роботи, які присвячені аналізу комплексних генотипів обох генів. Однак, незважаючи на всю їх актуальність, у них простежується суттєвий недолік – відсутність аналізу нерівноваги за зчепленням (Linkage Disequilibrium, LD) за використання відповідного аналітичного інструментарію, що призводить до суттєвого обмеження ефективності досліджень, внаслідок того, що гаплотипи розглядаються в якості простих комплексних генотипів [12].

Аналіз нерівноваги за зчепленням (LD) дає можливість визначити наявність гаплотипів, що, потенційно, дає цілу низку переваг, в першу чергу у можливості використання саме гаплотипів для вирішення завдань маркер-асоційованої селекції (MAS) у скотарстві. Використання гаплотипів в MAS є більш перспективним порівняно з окремими локусами та різними алельними варіантами, так як надає можливість використовувати „зв'язку” двох або більше мутацій (алелей) в якості єдиної функціональної одиниці. Це не тільки може сприяти адитивному ефекту від різних алелів, але й може суттєво знизити витрати на проведення контролю під час проведення селекційної роботи, так як контрольне типування особин тільки за одним з алелів автоматично буде вказувати на наявний гаплотип (тобто один з алелів може бути використаний у якості маркеру певного гаплотипу).

Таким чином, виходячи зі всього вищенаведеного, мета нашої роботи – провести аналіз розподілу частот гаплотипів та нерівноваги за зчепленням між локусами бета- та капа-казеїнів у популяції української чорно-рябої молочної породи.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України та в лабораторії молеку-



лярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН.

В якості об'єкта досліджень використовували популяцію корів української чорно-рябої молочної породи.

Виділення ДНК проводили з використанням комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», РФ). В якості джерела біологічного матеріалу використовували волосяні цибулини.

Типування особин ВРХ дослідних порід проводили за використання методів AS-PCR та RFLP-PCR.

Ампліфікацію фрагментів локусів *CSN2* та *CSN3* проводили за використання специфічних праймерів (табл. 1).

Таблиця 1

Нуклеотидна структура використаних праймерів

Локус	Праймер	Нуклеотидна послідовність	Джерело
<i>CSN2</i>	854 F	gccagatgagagaagtgagg	[14]
	854 R (A^1)	gatgtttgtgggaggctgttat	
	854 R (A^2)	gatgtttgtgggaggctgttag	
<i>CSN3</i>	DF	atagccaatatatccaattcagt	[15]
	DR	tttattaataagtccatgaatcttg	

У випадку з локусом *CSN2* розмір ампліфікованого фрагменту склав 854 п.н.; у випадку з *CSN3* – 530 п.н.

Ампліфікацію таргетних фрагментів проводили за використання термоциклору MiniAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) згідно відповідних програм. Для локусу *CSN2*: 1 цикл – денатурація 94 °C (5 хв.); 10 циклів – денатурація 94 °C (30 с), відпал 66 °C (30 с), елонгація 72 °C (30 с); 25 циклів – денатурація 94 °C (30 с), відпал 64 °C (30 с), елонгація 72 °C (30 с).

Для локусу *CSN3*: 1 цикл – денатурація 94 °C (5 хв.); 35 циклів – денатурація 94 °C (1 хв.), відпал 58 °C (1 хв.), елонгація 72 °C (1 хв.); 1 цикл – фінальна елонгація 72 °C (10 хв.).

Об'єм кінцевої суміші становив 10 μ L, концентрація праймерів – 0,2 мкМ у кожному випадку.

Рестрикцію (для локусу *CSN3*) проводили за використання ендонуклеази HindIII згідно протоколів виробника (Thermo Scientific, США). Продукти ампліфікації/рестрикції розділяли у агарозних гелях (концентрація 1,5–3%). Візуалізацію фрагментів ДНК у гелі проводили з використанням етидіуму броміду в ультрафіолетовому спектрі. Розмір ампліконів та рестрикційних фрагментів визначали за використання маркера молекулярних мас GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific).

Для визначення генетико-популяційних параметрів використовували наступні показники: частоти генотипів та алелей, значення фактичної (H_0) та очікуваної гетерозиготності (H_e), індекс фіксації Райта (F_{is}), ефективна кількість алелей (n_e). Всі розрахунки проведено за використання програми Popgen32 Version 1.32 [16].

Частоти гаплотипів визначали шляхом розрахунку EM-алгоритму за використання програми EH+ [17].

Розрахунки стандартизованої міри відхилення за зчепленням від рівноважного стану проводили з використанням програми 2LD [18].

Результати досліджень. За результатами проведених досліджень виявлений поліморфізм за локусом бета-казеїну (*CSN2*) у популяції корів української чо-



рно-рябої молочної породи. Встановлено наявність особин зі всіма можливими генотипами: A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2 . Електрофореграму продуктів ампліфікації дослідного фрагменту гену *CSN2* за використання методу AS-PCR наведено на рис. 1.

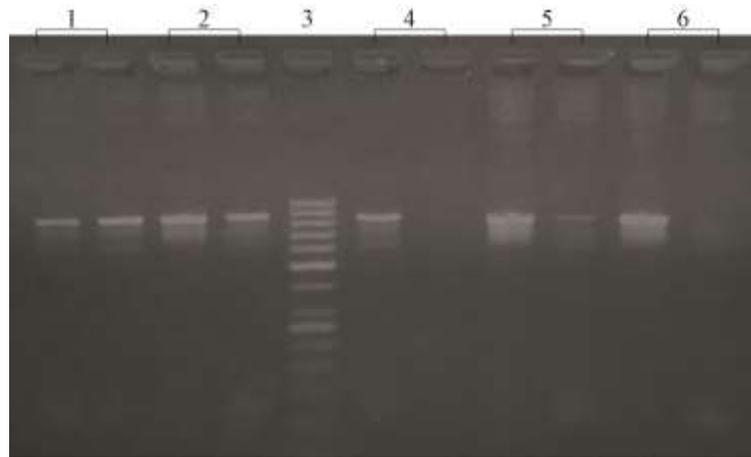


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагмента гену *CSN2*.

Примітка. 1-6 – номери проб, 1, 2 – генотип A^1A^2 ; 3 – GeneRuler 50 bp; 4-6 – генотип A^1A^1 .

За поліморфізмом локусу *CSN2* (метод алель-специфічної ПЛР) генотип A^1A^1 представлений у вигляді фрагмента ДНК, розміром 854 п.н., який є тільки в першій лунці кожній з проб. Генотип A^2A^2 представлений фрагментом у кожній другій лунці, в свою чергу, для генотипу A^1A^2 є характерним наявність обох фрагментів у кожній лунці.

Особливості генетичної структури дослідної популяції корів наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Генетична структура дослідній популяції ВРХ за локусом *CSN2*

Генотип	О	Е	$(O-E)^2/E$	Алель, частота	χ^2
A^1A^1	11	9,68	0,18	$A^1 - 0,44$ $A^2 - 0,56$	0,57
A^1A^2	22	24,64	0,28		
A^2A^2	17	15,68	0,11		

За загальними показниками генетичної мінливості за локусом *CSN2* дослідна популяція характеризується наступними значеннями: фактична гетерозиготність (H_o) – 0,44; очікувана гетерозиготність (H_e) – 0,49; індекс фіксації Райта (F_{is}) дорівнює 0,1; ефективна кількість алелей (n_e) – 1,96.

За результатами аналізу співвідношень частот генотипів та алелів дослідна популяція корів знаходиться в стані генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом.

Як ми бачимо з наведених даних у дослідній популяції корів є значна частка особин, гомозиготних за алелем A^2 , що робить їх потенційно привабливими для проведення подальшої MAS та формування груп тварин із виробництва молока певного типу.

Виходячи з завдань роботи, на наступному етапі проведені генетико-популяційні дослідження за локусом капа-казеїну. За результатами досліджень виявлений поліморфізм локусу *CSN3* в дослідній популяції корів. Встановлено



наявність особин з двома з трьох можливих варіантів генотипів – *AA* та *AB*. Особин із генотипом *BB* у дослідній популяції не виявлено.

Електрофореграма продуктів рестрикції дослідного фрагменту гену *CSN3* наведено на рис. 2.

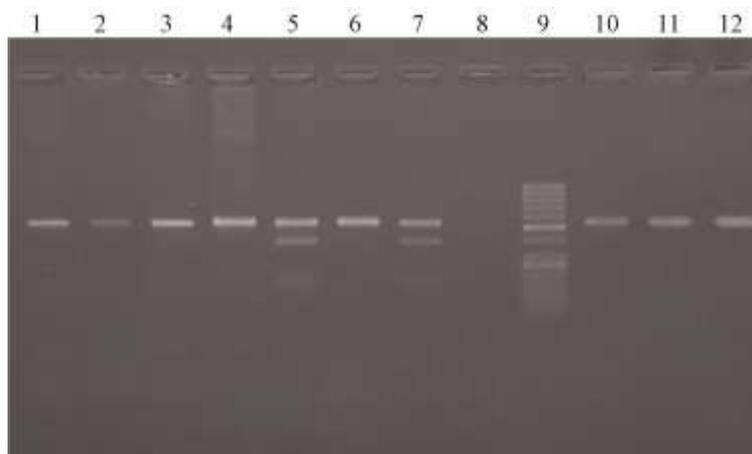


Рис. 2. Електрофореграма продуктів рестрикції фрагмента гену *CSN3*.

Примітка. 1-12 – номери проб, 1-4, 6, 10-12 – генотип *AA*; 5, 7 – генотип *AB*; 8 – негативний контроль; 9 – GeneRuler 50 bp.

За *HindIII*-поліморфізмом локусу *CSN3* генотип *AA* представлений одним фрагментом, розміром 530 п.н., генотип *BB* – 400 та 130 п.н., *AB* – 530, 400 та 130 п.н. відповідно.

Особливості генетичної структури дослідної популяції корів наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Генетична структура дослідній популяції ВРХ за локусом *CSN3*

Генотип	О	Е	(О-Е) ² /Е	Алель, частота	χ^2
<i>AA</i>	30	32	0,13	A – 0,8 B – 0,2	3,13
<i>AB</i>	20	16	1		
<i>BB</i>	0	2	2		

За загальними показниками генетичної мінливості за локусом *CSN3* популяція характеризується наступними значеннями: фактична гетерозиготність (H_o) – 0,40; очікувана гетерозиготність (H_e) – 0,32; індекс фіксації Райта (F_{is}) дорівнює - 0,25; ефективна кількість алелів (n_e) – 1,47. Слід зазначити, що у дослідній популяції виявлено значне переваження частоти зустрічальності алелю *A*, причому питома частка – саме за рахунок великої кількості гомозиготних особин *CSN3^{AA}*. Алель *B* присутній у популяції тільки у складі гетерозигот *CSN3^{AB}* (гомозиготних особин за алелем *B* не виявлено взагалі).

Незважаючи на значення індексу фіксації Райта (значення аутбридингу досягає 25 %) дослідна популяція корів знаходиться в стані генетичної рівноваги ($\chi^2=3,13$; $p>0,05$)

Перейдемо до аналізу розподілу частот гаплотипів на основі асоціацій алельних варіантів генів *CSN2* і *CSN3*. Результати аналізу особливостей розподілу



частот генотипів у дослідній популяції корів, що виконаний за використання ЕМ-алгоритму, наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

Розподіл частот гаплотипів у дослідній популяції корів

Гаплотип	Локус		Частоти гаплотипів	
	CSN2	CSN3	Незалежні	Асоційовані
I	A ¹	A	0,460	0,432
II	A ¹	B	0,115	0,143
III	A ²	A	0,340	0,368
IV	A ²	B	0,085	0,057

За порівнянням розподілу частот гаплотипів встановлені незначні відмінності у значеннях незалежних (розрахованих зі значень певних частот алелів) та асоційованих (оцінених за даними, що враховують асоціацію, за умови відповідності за Харді-Вайнбергом) частот. Найбільшу частоту зустрічальності має гаплотип I (CSN2^{A1}-CSN3^A; 0,46), найменшу (теоретичну) – IV (CSN2^{A2}-CSN3^B; 0,085). Слід зазначити, що частоту гаплотипу IV визначено саме за рахунок теоретичних розрахунків, так як у дослідній популяції тварин він, потенційно, зустрічається тільки у складі гетерозигот за обома маркерами в дослідних генах CSN2 та CSN3.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що в дослідній популяції корів української чорно-рябої молочної породи не спостерігається порушення стану рівноваги за зчепленням ($D' = 0,33$; що суттєво менше за критичного значення) між виявленими алельними варіантами локусів CSN2 та CSN3. Це свідчить про те, що розподіл частот гаплотипів є результатом особливостей розподілу частот відповідних алелів. Слід зазначити, що цей висновок стосується виключно конкретної популяції великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи. В інших популяціях цієї ж породи ситуація може бути зовсім іншою, що свідчить про необхідність проведення генетико-популяційних досліджень у кожному окремому випадку.

Додатково до результатів проведених досліджень, звернемо увагу на наявність методичних недоліків у деяких наукових роботах. Мова йде про плутанину між визначенням частот гаплотипів та комплексних генотипів. Розглядаючи гаплотипи, автори використовують аналіз частотного розподілу лише за результатами визначення значень частот відповідних складових гаплотипу, що, насправді, має відношення тільки до, так званих, “незалежних” частот гаплотипу. За відсутності визначення “асоційованих” частот гаплотипів провести адекватний аналіз та охарактеризувати значення стандартизованої міри нерівноваги D' фактично неможливо, що й призводить до плутанини у термінології (поняття гаплотип та комплексний генотип).

Відносно дослідної популяції корів наявна достатньо велика кількість особин із гомозиготним генотипом A²A² за локусом бета-казеїну, що свідчить про потенційну привабливість популяції для проведення спрямованої селекції (MAS), за умови типування плідників, у напрямку формування стада корів-продуцентів молока A2. З цієї точки зору, відсутність нерівноваги за зчепленням можна використовувати, також, й у якості особливості популяції, що дає змогу сформуванню будь-які можливі варіанти (гаплотипи) між певними локусами в напрямку як збільшення показників молочної продуктивності тварин, так і з метою отримання різних типів молочної продукції (сири).



Висновки:

1. За результатами досліджень встановлено, що у популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусом *CSN2* частота алелю A^1 склала 0,44; A^2 – 0,56. За локусом *CSN3* частота алелю A склала 0,8; алелю B – 0,2.
2. За використання аналізу розподілу гаплотипів доведено, що співвідношення частот гаплотипів (*CSN2-CSN3*) практично повністю визначається простим співвідношенням частот окремих складових гаплотипу (алелів локусів *CSN2* та *CSN3*). Значення стандартизованої міри нерівноваги D' дорівнює 0,33, що свідчить про відсутність порушень рівноваги за зчепленням між дослідними мутаціями локусів бета- та капа-казеїнів.

Бібліографічний список

1. Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell H. M., Harwalkar V. R., Jenness R., Whitney R. M. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science*. 1984. Vol. 67(8). P. 1599–1631. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81485-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81485-x).
2. Martin P., Bianchi L., Cebo C., Miranda G. Genetic Polymorphism of Milk Proteins. *Advanced Dairy Chemistry*. 2012. P. 463–514. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_15.
3. Jolles P., Levy-Toledano S., Fiat A.-M., Soria C., Gillessen D., Thomaidis A., Caen J. P. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from k-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*. 1986. Vol. 158(2), P. 379–382. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09764.x>.
4. Alexander L. J., Stewart A. F., Mackinlay A. G., Kapelinskaya T. V., Tkach T. M., Gorodetsky S. I. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *European Journal of Biochemistry*. 1988. Vol. 178(2), P. 395–401. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14463.x>.
5. Azevedo A. L. S., Nascimento C. S., Steinberg R. S., Carvalho M. R. S., Peixoto M. G. C. D., T'eodoro R. L., Verneque R. S., Guimarães S. E. F., Machado M. A. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*, 2008. Vol. 7 (3), 623–630. <https://doi.org/10.4238/vol7-3gmr428>.
6. Cinar M. U., Akyuz B., Arslan K., & Ilgar E. G. Genotyping of the kappa-casein and beta-lactoglobulin genes in Anatolian water buffalo by PCR-RFLP. *International Journal of Dairy Technology*, 2015. Vol. 69(2), P. 308–311. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12257>.
7. Margawati E. T., Volkandari S. D., Indriawati C. T. Genotyping of Kappa-Casein Gene of Buffalo in Indonesian. *Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology*. 2016. P. 37–44. <http://dx.doi.org/10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.37-44>.
8. Miluchova M., Trakovicka A., Gabor M. Analiza polimorfismului genei β -cazeinei prin metoda PCR-RFLP pentru alelele $A1$ și $A2$ la taurinele de rasă Pinzgau Slovacă. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 2009. Vol. 42 (2).
9. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *EFSA Journal*, 2009. Vol. 7(2), 231 p. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.231r>.
10. Гуськова С. В. $A2$ молоко – продукция для детского питания. *Информ. Бюлетень № 1 Национального союза племенных организаций*. Москва. 2017.
11. Ладика В. І., Склярєнко Ю. І., Павленко Ю. М. Характеристика генетичної структури плідників лебединської породи за генами бета- (*CSN2*) та капа-



казеїну (CSN3). *Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»* 2020. № 2, С. 88–96.

12. Ладика В. І., Скляренко Ю. І., Павленко Ю. М. Аналіз бугаїв-плідників молочних порід за комплексними генотипами бета- і каппа казеїну. *Розведення і генетика тварин*. 2020. № 60. С. 99–109.

13. Bonfatti V., Di Martino G., Cecchinato A., Degano L., Carnier P. Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes, β -lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*. 2010. Vol. 93(8), P. 3809–3817. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2779>.

14. Keating A., Smith T., Ross R., Cairns M. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2008. Vol. 47 P. 99–104.

15. Denicourt D., Sabour M. P., McAllister A. J. Detection of bovine κ -casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. *Animal Genetics*. 1990. Vol. 21(2). P. 215–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1990.tb03228.x>.

16. Yeh F. C., Yang R., Boyle T. J., Ye Z., Xiyan J. M. PopGene32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. *Mol. Biol. Biotechnol. Centre, Univ. Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*. 2000.

17. Zhao J. H., Curtis D., Sham P. C. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered*. 2000. Vol. 50, 133–139.

18. Zapata C., Carollo C., Rodriguez S. Sampling variance and distribution of the D measure of overall gametic disequilibrium between multiallelic loci. *Ann Hum Genet*. 2001. Vol. 65. P. 395–406.

References

1. Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M., Harwal-kar, V. R., Jenness, R., & Whitney, R. M. (1984). Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science*, 67(8), 1599–1631. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81485-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81485-x).

2. Martin, P., Bianchi, L., Cebo, C., & Miranda, G. (2012). Genetic Polymorphism of Milk Proteins. *Advanced Dairy Chemistry*, 463–514. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_15.

3. Jolles, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A.-M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., & Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158(2), 379–382. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09764.x>.

4. Alexander, L. J., Stewart, A. F., Mackinlay, A. G., Kapelinskaya, T. V., Tkach, T. M., & Gorodetsky, S. I. (1988). Isolation and characterization of the bovine κ -casein gene. *European Journal of Biochemistry*, 178(2), 395–401. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14463.x>.

5. Azevedo, A. L. S., Nascimento, C. S., Steinberg, R. S., Carvalho, M. R. S., Peixoto, M. G. C. D., T'eodoro, R. L., Verneque, R. S., Guimarães, S. E. F., & Machado, M. A. (2008). Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 623–630. <https://doi.org/10.4238/vol7-3gmr428>.

6. Cinar, M. U., Akyuz, B., Arslan, K., & Ilgar, E. G. (2015). Genotyping of the kappa-casein and beta-lactoglobulin genes in Anatolian water buffalo by PCR-RFLP. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 308–311. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12257>.



7. Margawati, E. T., Volkandari, S. D., & Indriawati, C. T. (2016). Genotyping of Kappa-Casein Gene of Buffalo in Indonesian. *Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology*. 37–44. <https://doi.org/10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.37-44>.
8. Miluchova, M., Trakovicka, A., & Gabor, M. (2009). Analiza polimorfismului genei β -cazeinei prin metoda PCR-RFLP pentru alelele. AI și A2 la taurinele de rasă Pinzgau Slovacă. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologiei*, 42 (2).
9. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. (2009). *EFSA Journal*, 7(2), 231r. doi:10.2903/j.efsa.2009.231r.
10. Gus'kova, S. V. (2017). A2 moloko – produkciya dlya detskogo pitaniya. *Inform. Byulleten'. Nacional'nyj soyuz plemennykh organizacij*. №1. Moskva.
11. Ladyka, V. I., Skliarenko, Yu. I., & Pavlenko, Yu. M. (2020). Kharakterystyka henetychnoi struktury plidnykiv lebedynskoi porody za henamy beta-(CSN2) ta kapa-kazeinu (CSN3). *Zbirnyk naukovykh prats «Tekhnolohiia vyrobnytstva i pererobky produktsii tvarynnytstva»*. 2, 88–96.
12. Ladyka, V. I., Skliarenko, Yu. I., & Pavlenko, Yu. M. (2020). Analiz buhaiv-plidnykiv molochnykh porid za kompleksnymy henotypamy beta- i kappa kazeinu. *Rozvedennia i henetyka tvaryn*, 60, 99–109.
13. Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Degano, L., & Carnier, P. (2010). Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes, β -lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3809–3817. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2779>.
14. Keating, A., Smith, T., Ross, R., & Cairns, M. (2008). A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 47, 99–104.
15. Denicourt, D., Sabour, M. P., & McAllister, A. J. (1990). Detection of bovine κ -casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. *Animal Genetics*, 21(2), 215–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1990.tb03228.x>.
16. Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T. J., Ye, Z., & Xiyang, J. M. (2000). PopGene32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. *Mol. Biol. Biotechnol. Centre, Univ. Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*.
17. Zhao, J. H., Curtis, D., & Sham, P. C. (2000). Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered*. 50, 133–139.
18. Zapata, C., Carollo, C., & Rodriguez, S. (2001). Sampling variance and distribution of the D measure of overall gametic disequilibrium between multiallelic loci. *Ann Hum Genet.*, 65, 395–406.

ANALYSIS OF HAPLOTYPE FREQUENCY DISTRIBUTION BY CSN2 AND CSN3 LOCUS IN THE CATTLE POPULATION OF THE UKRAINIAN BLACK-AND-WHITE DAIRY BREED

Kulibaba R. O., Sakhatskyi M. I., National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Liashenko Yu.V., Institute of Animal Science NAAS

The study of the genetic structure of the cow population of the Ukrainian Black-and-White dairy breed were carried out in loci of beta-casein (CSN2) and kappa-casein (CSN3) loci, and the distribution of haplotype frequencies was analyzed. The polymorphism of the experimental loci was determined using AS-PCR (allele-specific PCR) in the case of CSN2 and PCR-RFLP (restriction analysis) in the case of CSN3.



The frequencies of genotypes and alleles, the value of observable (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, the Wright fixation index (F_{is}) and the effective number of alleles (n_e) were determined based on the results of the studies. Haplotype frequencies were determined by calculating the EM-algorithm using the EH+ program. Calculations of the standardized measure of deviation by linkage from the equilibrium state were made using the 2LD program. According to the results of the studies, polymorphism was revealed for both experimental loci in the cattle population of the Ukrainian Black-and-White dairy breed. At the CSN2 locus, the A1 allele frequency was 0.44; A2 – 0.56. At the CSN3 locus, the A allele frequency was 0.80; allele B – 0.20. The experimental cattle population was in a state of genetic equilibrium in accordance with both polymorphic loci. Based on the analysis of the haplotype frequencies distribution, haplotype CSN2A1-CSN3A was found to have the highest frequency (0,46), haplotype CSN2A2-CSN3B had the smallest (0,085). In the experimental cattle population of the Ukrainian Black-and-White dairy breed there is no deviation from the equilibrium state by linkage ($D' = 0.33$; which is significantly less than the critical value) between the identified allelic variants of the CSN2 and CSN3 loci. This indicates that the distribution of haplotype frequencies is the result of the particularities of the corresponding alleles frequency distribution.

Keywords: polymorphism, population, cows, allele, genotype, haplotype, linkage, marker.

DOI 10.32900/2312-8402-2022-128-104-118

УДК 57.08:636.082.4

ВПЛИВ РОЗЧИНІВ РІЗНОЇ ОСМОЛЯРНOSTІ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ 15-32-КЛІТИННИХ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Лісін В. І., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0002-5461-0918>

Хмельков В. М., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0002-6185-9383>

Бугров О. Д., д. б. н., професор

Дібіров М. К., д. б. н., с. н. с.

Інститут тваринництва НААН

Отримано ілюстративний матеріал, що дозволяє наочно спостерігати дію розчинів різної тоничності на морфологію отриманих in vivo 5-денних докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів і 6-денних ранніх морул великої рогатої худоби в залежності від їх технологічного стану.

У ембріонів досліджуваних стадій розвитку були визначені середні значення і показники варіації наступних морфометричних параметрів: зовнішнього та внутрішнього діаметрів прозорої оболонки (zona pellucida (ZP)), товщини ZP, діаметру клітинної маси (KM) ембріона та діаметру окремих ембріональних клітин. Перелічені параметри визначалися у кожного з ембріонів послідовно в інтактному, денудованому і дебластомерізованому станах в ізотонічних (0,29 Осм), гіпертонічних (1,5 Осм) та гіпотонічних (0,2 Осм) умовах.

Маніпуляції з ембріонами були проведені таким чином, щоб при послідовному перенесенні по розчинах різної осмолярності можна було ідентифікувати динаміку зміни морфології і параметрів як кожного з ембріонів (в інтактному